

Année 1970

THÈSE

NO

824

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Anne-G. GAJDOS-PREUSS

née le 6 avril 1938 à NEUILLY-sur-SEINE (92)

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le

CONSERVATION DE LA CORNEE

AUX BASSES TEMPERATURES

Techniques et contrôle d'efficacité

Président : M. Guy OFFRET, Professeur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Année 1970

THÈSE

NO

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Anne-G. GAJDOS-PREUSS

née le 6 avril 1938 à NEUILLY-sur-SEINE (92)

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le

CONSERVATION DE LA CORNEE

AUX BASSES TEMPERATURES

Techniques et contrôle d'efficacité

Président : M. Guy OFFRET, Professeur



A mon maître

Monsieur le Professeur Guy OFFRET
Ophtalmologiste des Hôpitaux

qui m'a appris la curiosité.

A mon maître

Monsieur le Professeur Paul PAYRAU
Professeur Agrégé du Val de Grâce
Ophtalmologiste de la Fondation A. de Rothschild

qui m'a donné l'idée de commencer ce
travail, les moyens de le faire, et l'obs-
tination de le poursuivre.

A mon maître

Monsieur le Docteur Pierre-Victor MORAX

qui m'a appris la rigueur.

A mon maître

Le Docteur Etienne JOSEPH
Ophtalmologiste des hôpitaux

qui m'a appris la patience.

A mes maitres d'Internat,

Le Professeur Agrégé Martine FONTAINE
Le Professeur Agrégé Bertrane AUVERT
Le Docteur Raymond HOUDART
Le Professeur Paul BREGEAT
Le Professeur Agrégé Yves POULIQUEN

A mes maitres d'Externat

Le Docteur Paul PADOVANI
Le Docteur Marcel MORIN
Le Professeur Raoul KOURILSKY

qui m'ont donné le goût de la médecine,
en témoignage d'amitié reconnaissante.

A ceux qui m'ont aidée à faire ce travail

Le Docteur Jean-Pierre FAURE
Le Docteur Jean-Antoine BERNARD
Le Docteur René-Gilles BERNIER
Madame Claudine BRONSTEIN

INTRODUCTION

La greffe d'organe ou de tissu, remplaçant une partie irrémédiablement malade d'un organisme vivant par son homologue en bon état de fonctionnement prélevé sur cadavre, devient un acte thérapeutique de plus en plus envisageable, et qui a apporté sa pathologie et ses problèmes propres.

La seule greffe de valeur fonctionnelle actuellement praticable en ophtalmologie est la kératoplastie, dont les indications s'étendent de plus en plus, dans le traitement palliatif des lésions dégénératives, toxiques et infectieuses. Contrairement à la keratoplastie lamellaire, la keratoplastie transfixiante, remplaçant toute l'épaisseur de la cornée, exige la présence sur le greffon d'un endothelium non seulement vivant, mais aussi fonctionnel, capable de pomper l'eau de l'Humeur Acqueuse et à la rejeter dans la Chambre Antérieure, empêchant l'oedème, puis l'opacification du greffon (72 -74-134-159).

Ainsi se posera, comme dans toute greffe fonctionnelle, le problème de l'état de conservation du greffon, et plus particulièrement de l'endothélium, l'épithélium n'étant pas nécessaire (il repousse le plus souvent en 48 h.) et le stroma jouant un rôle essentiellement architectonique.

Le moyen le plus simple est évidemment le prélèvement du greffon dans les heures qui suivent le décès du donneur, et dans celles qui précèdent la greffe. Ce qui pose des problèmes pratiques non négligeables, même dans les conditions privilégiées d'un grand centre hospitalier, et très importants dans des centres plus petits et plus isolés, sans compter le problème des urgences.

La méthode la plus simple est la conservation au frigidaire (à + 4°C environ) dans un milieu protecteur, type corps gras (162-163) ou nutritif = sérum physiologique, grosses molécules, milieu de Ringer (32), de Hanks, de Earle, ou surtout sérum d'animal homologue, dilué ou non (146-147-171-173). On peut également conserver les globes simplement en chambre humide stérile.

Une telle méthode de conservation au frigidaire a déjà été employée par Magitot en 1911 (92-93), lui permettant de conserver jusqu'à 20 jours des cornées de lapins utilisables pour kératoplasties trans-

fixiantes. Expérience renouvelée beaucoup plus récemment en 1963 par Stocker et Coll. (173), avec le même résultat. Cependant, ceci représente encore un délai assez bref, et surtout n'est pas applicable à la cor-
née humaine, dont l'endothelium ne semble guère tolérer plus de 48 heures de conservation dans ces conditions (162-163-170)

La dessiccation peut se faire

- soit sous vide après congélation (lyophilisation : 90-170)
- soit par produits déshydratants à température ordinaire : et parmi ces derniers procédés, la silico-dessiccation semble être l'un des plus satisfaisants (129-130-131-132).

La dessiccation garantit l'intégrité des structures histologiques, semble diminuer l'antigénicité, mais ne respecte pas la vitalité cellulaire, donc le fonctionnement de l'endothélium, et est actuellement réservée aux greffes lamellaires (124-128-129-130-131-132-133).

Enfin la congélation à très basses températures a soulevé l'espoir de mettre les cellules en état de vie latente, permettant à la fois une conservation de longue durée des cellules endothéliales et le maintien de leurs capacités fonctionnelles.

Dès lors, se pose un double problème pour chaque tissu :

- mise au point de la technique de congélation la plus favorable : et il semble bien que, s'il existe certaines règles très générales, chaque tissu ait ses impératifs propres,
- mise au point d'une technique de contrôle expérimental de la qualité fonctionnelle du tissu conservé.

Nous avons essayé de regrouper, de confronter, et d'expé-
rimer dans la mesure de nos moyens, les différentes solutions apportées jusqu'à maintenant à ces deux problèmes.

CONTROLE DE LA VIABILITE ET DU FONCTIONNEMENT CELLULAIRE

Déterminant dans le choix d'une méthode de conservation, ce contrôle pose un problème préliminaire qui nous semble très imparfaitement résolu. Il s'agit ici de trouver un test permettant d'affirmer la présence d'un endothélium vivant et fonctionnel.

On peut grossièrement classer les différentes méthodes jusqu'à maintenant proposées en:

- Examens histologiques.
 - . colorations morphologiques classiques
 - . colorations vitales
 - . méthodes histo-enzymatiques
- Culture de tissus.
- Tests métaboliques.
 - . par incorporation de radio-éléments
 - . par investigations physiques ou chimiques diverses
- Kératoplastie, surtout avec repérage des cellules endothéliales du donneur et du receveur (par les chromatines sexuelles ou marquage radio-isotopique)

Avant d'appliquer chacune de ces méthodes à nos cornées congelées, nous avons essayé de les tester sur des séries de cornées de lapin prélevées puis vieilles au frigidaire (soit cornée seule en sérum homologue, soit globe entier) durant des périodes allant de quelques heures à 15 jours. Notre but était de sélectionner la méthode de contrôle donnant le meilleur parallélisme avec la durée de conservation au frigidaire, et permettant donc une appréciation à peu près correcte du degré d'altération cellulaire.

Nous verrons successivement pour chaque méthode

- les techniques d'expérimentation
- les résultats obtenus par d'autres équipes
- nos propres résultats
- la critique que l'on peut en tirer.

I. - LES METHODES HISTOLOGIQUES.

A/ Colorations morphologiques.

1) Techniques d'examen.

Elles sont relativement simples et classiques. La particularité est ici que l'endothélium se composant d'une seule couche cellulaire, on peut l'examiner à plat dans son ensemble,

- soit après l'avoir clivé, avec la Descemet, du reste de la cornée : manoeuvre délicate, et toujours un peu traumatisante, mais qui donne des préparations minces et d'examen commode. Cet isolement est réalisé assez facilement sur la cornée fixée, il est beaucoup plus difficile sur la cornée fraîche.
- soit en gardant l'ensemble de la cornée examinée sur la lame, endothélium vers le haut : l'observation sera moins précise, du fait de la présence des couches sous-jacentes, mais la manipulation est moins traumatisante, et plus simple pour un examen rapide

a) La fixation peut se faire

- à l'acide osmique : (57), qui est sans doute le meilleur fixateur des cellules endothéliales, donnant le moins d'artefacts de fixation. Il est beaucoup utilisé en microscopie électronique. Il présente deux inconvénients :
 - l'important degré de noircissement des préparations, qui oblige ici à cliver Endothélium et Descemet pour l'examen,
 - la gêne qu'il apporte aux colorations ultérieures.
- au sublimé,
- au formol, en fait peu favorable dans le cas qui nous intéresse :
 - il durcit beaucoup les préparations, et rend très difficile le clivage de l'endothélium et de la Descemet.
 - surtout il entraîne une densification du noyau et une vacuolisation du cytoplasme, source d'artefacts.
- aux fixateurs alcooliques, et surtout la solution de Carnoy, qui donne une fixation rapide, sans durcissement important, conservant les affinités tinctoriales. (C'est notamment un excellent fixateur du noyau)

Quel que soit le produit employé, la fixation devra se faire immédiatement après le prélèvement, ou juste au stade de vieillissement ou de conservation que l'on désire examiner.

b) La coloration, touchant électivement les différents éléments cellulaires dispose de méthodes multiples, dont nous ne citerons que les principales.

- coloration des membranes par

- . examen en contraste de phase après simple fixation à l'acide osmique,
- . imprégnation argentique (154-161)

- coloration du cytoplasme par

- . l'éosine
- . le picro-indigo-carmin.

- coloration des noyaux:

Le plus simple est l'hématéine ou l'hématoxyline, et notamment l'hématoxyline de Harris (57-115-161), la plus employée.

- enfin certains auteurs ont utilisé l'orange acridine (160) avec examen microscopique en fluorescences qui permet de visualiser simultanément les noyaux et certains éléments cytoplasmiques.

2) Résultats antérieurs.

On a pu ainsi mettre en évidence, sur des cornées conservées in vitro sans protection particulière, des aspects purement morphologiques de vieillissement et de dégénérescence cellulaire.

- cytoplasmique : (120) = agglutination en mottes, et surtout vacuolisation qui peut devenir très importante, formant de grandes lacunes intra-cellulaires.
- modification des membranes (120) créant des espaces vides inter-cellulaires.
- agglutination en mottes des chromatines (150), puis gonflement du noyau, vacuolisation, et enfin disparition des structures cellulaires.

On a pu également observer des lésions après cryo coagulation cornéenne ab externo in vivo :

- karyorrhexie, pyknose ou karyolyse du noyau (18-19)

- vacuolisation et déformation nucléaire et cytoplasmique
(179)

3) Expérimentation personnelle.

a) Technique, sur les cornées de lapins. Après quelques essais, nous avons repris les méthodes qui nous ont paru les plus faciles à standardiser et à lire rapidement :

- prélèvement de la cornée avec une collerette de sclère.
- fixation dans la solution de Carnoy =

Alcool absolu 600 cc
Acide acétique pur 100 cc
Chloroforme 300 cc

Cette fixation était prolongée, au début de notre expérimentation, durant 16 à 20 heures. La présence d'artefacts nous a amenés à la réduire progressivement jusqu'à 30 minutes, temps finalement adopté, et qui nous a donné des résultats satisfaisants.

- la cornée est alors posée sur une cupule de paraffine, endothélium vers le haut, et les colorations successives faites en versant quelques gouttes du colorant dans la concavité.

- . Hématoxyline de Harris = 6 minutes environ (des essais à l'hématoxyline de de Groat avaient donné une coloration extrêmement faible, même après une incubation de 20 minutes)

- . Eosine = 3 minutes environ.

- prélèvement de rondelles ou de bandes de cornée entière :

- . les rondelles sont prélevées au trépan 4 millimètres
- . les bandes découpées au rasoir.

- les fragments peuvent être montés en entier, après déshydratation aux alcools et passage au Toluène. On réalise de préférence l'isolement de l'endothélium et de la Descemet, avec le moins possible de lames. Cette manipulation est faite avec des pinces fines, plates et coudées, sous stéréo-microscope, la pièce restant toujours dans l'alcool à 50 %. Puis elle est placée sur lame déshydratée à l'alcool absolu et passée au Toluène. Le montage se fait en De Pe X.

b) Résultats.

Nous avons étudié ainsi les cornées de globes de lapins gardés entiers en chambre humide à + 4° pendant des temps variables.

Sur chaque cornée il a été prélevé 4 rondelles, dont deux ont été colorées à l'hématoxyline de Harris (10 minutes) à température du laboratoire (les deux autres rondelles ont été gardées pour examen au vert Lissamine).

- sur les cornées fraîches : les noyaux ont un aspect réni-forme caractéristique, ils sont de taille normale et régulière. Le cytoplasme apparaît assez homogène.

- durant les premières 24 heures :

- . l'aspect des cellules reste très proche de la normale,
- . on note cependant l'apparition par endroits, de quelques petites vacuoles intracytoplasmiques, et un léger gonflement des noyaux.

Ces modifications vont s'accroître dans les jours suivants :

- après 48 heures = la plupart des cellules sont très vacuolisées

les noyaux se gonflent et ont tendance à devenir ovales.

- au 4ème jour :

- . il existe des lacunes plus ou moins étendues de la couche endothéliale : dans ces régions, les cellules endothéliales se sont probablement désolidarisées des plans sous-jacents, sous l'effet des traumatismes liés à la manipulation. Ce qui traduit une tendance au décollement de l'ensemble de l'endothélium.
- . toutes les cellules présentes sont très altérées : les uns avec noyau gonflé, ovalaire et cytoplasme vacuolisé, les autres, notamment au bord des lacunes, avec noyau dense et contracté, cytoplasme réduit à des filaments ou des trainées irrégulières limitant de vastes vacuoles.

Ces cellules très altérées ont tendance à s'éliminer, soit individuellement, soit par groupes.

4) Critique de la méthode.

Méthode : simple, relativement rapide, très reproductible, elle donne des renseignements certes incomplets, mais fidèles. Elle nous a paru d'une sensibilité assez grande, puisqu'elle accuse déjà des altérations au-delà de 24 heures de conservation en chambre humide à + 4°.

Il persiste évidemment le risque pratique de créer des artefacts lors de la fixation, ce qui exige une standardisation sévère de la méthode. Cependant avec la fixation que nous avons employée et en réduisant la durée de fixation à 30 minutes, il nous a semblé obtenir un minimum d'artefacts, d'artefacts, et notamment pas de vacuolisation.

Il reste évidemment une objection théorique importante : si on peut admettre que les altérations fonctionnelles majeures s'accompagneront pratiquement toujours de modifications morphologiques, celles-ci risquent de manquer aux premiers stades d'altération fonctionnelle. Il est difficile d'apprécier dans quelle mesure un aspect morphologique donné correspond à une modification fonctionnelle précise

Malgré cela, la coloration morphologique nous a semblé une bonne méthode de base pour un tri initial pratique des greffons susceptibles de donner un résultat correct.

Elle a en outre l'avantage de permettre des préparations définitives.

B/ Coloration vitale.

Elle est définie par Gabé comme une coloration faite sur les cellules vivantes et permettant non seulement une observation morphologique, mais un constat physiologique.

La pénétration et la répartition du colorant dans les cellules dépendra :

- de la cellule : perméabilité plus ou moins grande des membranes, aptitude des différents éléments à fixer le colorant.
- mais aussi de la nature du colorant et des propriétés physico-chimiques du solvant.

Il s'agit donc d'un phénomène très complexe, dont l'interprétation physiologique exige une connaissance approfondie des conditions physico-chimiques du solvant.

1) Techniques : Les colorants utilisés pour ce test de vitalité cellulaire sont des colorants anioniques, qui ont la propriété de se fixer sur les vacuoles. Celles-ci sont présentes, mais minuscules, dans les cellules vivantes : on obtiendra alors une coloration punctiforme. Dans les cellules altérées ou mortes, la vacuolisation s'étend de plus en plus, et avec elle la coloration, au maximum, la cellule n'est plus qu'une grande vacuole (crinome), elle apparaît alors colorée en masse, sauf le noyau.

Divers colorants ont été employés : bleu de méthylène - Eosine Y, Erythrosine B, Nigrosine, et surtout bleu trypan et vert lissamine (55) qui semblent les plus intéressants. Il est à noter cependant que ces méthodes ont été employées surtout sur des cellules en suspension, et que l'application à une couche mono-cellulaire in situ représente une extrapolation....

2) Résultats.

- le bleu Trypan (43.55.171) semble donner des résultats parallèles à ceux des colorations enzymatiques au Nitro-Blue-Tetrazolium, avec une marge d'interprétation plus faible dans la mesure où l'on considère comme lésées toutes les cellules colorées (171). Il comporte cependant une cause d'erreur propre : le degré de coloration est fonction de la durée d'incubation (155).
- le vert Lissamine a été étudié par Holmberg (55) sur des suspensions de cellules tumorales intactes et lésées par congélation brutale. Comparant les résultats de cette coloration, à ceux obtenus par coloration enzymatique, mesures spirométriques et microcinématographie, il constate que:
 - . les cellules indemnes, ou n'ayant que des lésions discrètes et réversibles, ne laissent pénétrer le vert Lissamine qu'en petites vacuoles punctiformes
 - . alors que les cellules gravement endommagées se colorent de façon massive.

Fait intéressant, la durée d'incubation (à 37°C) ne semble pas jouer de rôle dans l'intensité de la diffusion du colorant .

Cette coloration, reprise par Jans (64) sur l'endothélium cornéen de chat semble montrer :

- . l'absence de coloration des cellules intactes,
- . la coloration immédiate après le moindre traumatisme mécanique (plicature, passage d'un fil de gaze)
- . mais aussi un pourcentage de cellules colorées très bas : 5 % seulement, après 50 heures de conservation au frigidaire sans protection particulière, fait qui reste encore à expliquer.

3) Expérience personnelle.

Technique.

La coloration a été faite pour chaque cornée sur deux des rondelles prélevées au trépan, les deux autres ayant été fixées et colorées à l'hématoxyline.

Les deux rondelles sont colorées pendant 20 minutes dans une solution à 1 % de vert Lissamine en sérum physiologique, à température du laboratoire. Elles sont ensuite posées sur lame et observées directement au microscope.

Résultats.

Sur des cornées de lapins provenant de globes gardés en chambre humide à + 4° pendant des temps variables on a trouvé :

- sur la cornée fraîche : pratiquement aucune coloration, seulement une très faible imprégnation uniforme des noyaux.
- après 24 et 48 heures de conservation la couche endothéliale est partout présente. Elle prend une coloration très faible et diffuse, un peu accentuée par places.
- après 3 jours : apparaissent des lacunes dans la couche endothéliale. Des plages de cellules, en particulier au bord des lacunes, se colorent un peu plus fortement par le vert Lissamine qui imprègne à la fois le noyau et le cytoplasme, mais non les vacuoles. Des cellules éparses sur la surface de la cornée se colorent de la même manière. Au microscope à contraste de phase, on constate que ces cellules plus colorées ont un noyau plus petit et plus dense que les autres, et surtout que leur cytoplasme est dissocié par de grandes vacuoles.

4) Critique de la méthode.

Cette méthode, séduisante au premier abord par sa simplicité et son côté "fonctionnel" présente cependant des inconvénients,

- outre qu'on en connaît mal le mécanisme intime,
- la marge laissée à l'interprétation personnelle reste assez grande,
- elle ne permet pas de préparation définitive, donc de comparaison entre plusieurs séries,

- enfin elle nous a semblé plutôt moins sensible que la coloration morphologique simple : les cellules prenant la coloration vitale montraient également des altérations morphologiques sévères. Par contre, des altérations morphologiques plus discrètes ne s'accompagnaient pas nécessairement de coloration au vert Lissamine.

Il faut noter enfin que nous n'avons pas retrouvé avec le vert Lissamine, la coloration élective des vacuoles, classiquement décrite, ce qui peut être imputable à un défaut de notre technique.

C/ Microscopie électronique.

L'étude de l'aspect ultra-structural de l'endothélium cornéen (17 bis - 85), aussi bien que des altérations cellulaires dues à la congélation et au dégel (156) est encore restée assez limitée.

Elle apportera très probablement un complément important aux études morphologiques (état des mitochondries, organisation des membranes inter-cellulaires), pouvant revêtir une signification fonctionnelle. Elle ne saurait être considérée comme un examen de routine.

Nous n'avons pu la faire entrer dans le cadre de cette expérimentation, mais espérons en faire l'objet d'une prochaine étude...

D/ Colorations histo-enzymatiques.

C'est la mise en évidence des enzymes cellulaires par l'apport simultané :

- du substrat correspondant à l'enzyme que l'on veut tester,
- d'un colorant, qui précipite au contact du produit de la réaction enzymatique.

1) Techniques.

La coloration se fait sur cornée fraîche. Les enzymes habituellement testés sur l'endothélium cornéen sont des enzymes respiratoires; des hydrolases notamment.

On fait incuber à 37°C la cornée dans le mélange substrat + colorant (préparés extemporanément) le colorant employé est le Nitro-Blue-Tétrazolium (N.B.T.).

La pièce peut dès lors être fixée en solution de Carnoy, ou mélange acide acétique - alcool, montée et conservée, au moins un certain temps (la coloration pâlit peu à peu).

2) Résultats : deux modes d'interprétation semblent possibles, reposant tous deux sur la même idée que la paroi cellulaire en bon état crée une barrière efficace entre l'enzyme contenu dans la cellule et le substrat ajouté au milieu extérieur.

a) Si on examine un endothélium coloré par cette technique sans avoir subi aucun traitement préalable, on admet que la jonction enzyme-substrat-colorant ne peut se faire que si la membrane cellulaire est altérée. On obtiendra alors une coloration d'autant plus intense pour une cellule donnée qu'elle est plus altérée. L'importance et l'extension de la coloration d'un endothélium cornéen seront d'autant plus grandes que la cornée est moins bien conservée (85-134-140-145-106-107-123). La coloration enzymatique devient ici une forme de coloration vitale, et donne effectivement des résultats parallèles à ceux de la coloration par le bleu Trypan.

b) La seconde méthode consiste à faire subir aux cellules un double pré-traitement.

- lavage au sérum physiologique, pour éliminer tous les enzymes qui auraient pu fuir des cellules lésées.
- destruction brutale des cellules saines restantes, par refroidissement brutal par exemple (75) : dès lors ces cellules laissent fuir leurs enzymes.
- la coloration enzymatique mettra alors en évidence les enzymes des cellules préalablement saines, ainsi rendues perméables. Le résultat est donc ici l'inverse du précédent : moins une cellule est colorée, plus on peut admettre qu'elle était préalablement abimée... C'est la méthode adoptée par Kaufman et Coll.

3) Expérience personnelle sur les cornées de lapins.

Nous avons utilisé la première méthode, selon O'Neil et Coll. (123), prenant comme substrat le succinate de Sodium. Nous avons pris soin d'utiliser une méthode strictement standardisée, avec préparation extemporanée des solutions de substrat et de colorant, et incubation de deux cornées témoins (pour chaque série) avec le colorant seul, sans substrat.

Sur une série de cornées "vieillies" au frigidaire sans protection particulière, nous avons obtenu les résultats indiqués au tableau (1). On peut observer

- d'une part, que ces résultats sont plus conformes à ceux de la seconde méthode (Kaufmann). Ce qui s'explique probablement par le fait que le vieillissement s'étant fait endothélium au contact soit de l'humeur acqueuse, soit

TABLEAU (1) - COLORATION ENZYMATIQUE DE CORNEES VIEILLIES

à + 4°

Durée de conservation au Frigidaire après prélèvement.	Mode de conservation.	Nombre de cornées	Intensité de coloration
Témoins frais		12	Modérée, mais nette.
Moins de 2 jours	Globe entier en chambre humide	12	Très semblable aux témoins frais.
2 à 4 jours	id.	12	Plus pâle que témoins frais.
Plus de 4 jours	id.	12	Endothélium totalement absent : s'est épluché lors du prélèvement de la cornée.
Moins de 2 jours	Cornée isolée en sérum physiologique.	12	Semblable aux témoins frais.
	Cornée isolée en sérum de lapin.	12	id.
Plus de 3 jours	Cornée isolée en sérum physiologique.	12	Très pâle. Pas de gradation entre 4 et 15 jours.
	Cornée isolée en sérum de lapin.	12	id.

de sérum physiologique, soit de sérum homologue, le lavage préalable était réalisé en même temps.

- on n'a pas obtenu des différences de coloration assez franches et homogènes pour pouvoir établir une gradation précise dans le degré de vieillissement. La seule différence nette se situe entre une conservation inférieure ou supérieure à 2 ou 3 jours.
- enfin, dans un certain nombre de séries, qui ne figurent pas dans les chiffres donnés ici, les endothéliums témoins incubés avec le seul N.B.T. étaient colorés comme les autres.

4) Critique de la méthode.

Séduisante au premier abord par son aspect de test métabolique, cette méthode soulève cependant une double critique, théorique et pratique.

Théorique,

Sur chaque préparation, on ne peut tester que 1 enzyme, ce qui permet, au mieux, pour une cornée, de tester 4 à 5 enzymes sur 4 ou 5 fragments différents. Même en multipliant les expériences sur des cornées traitées de façon semblable, il est difficilement concevable de tester un nombre significatif d'enzymes, par rapport aux quelques centaines que contient une cellule (95).

L'existence d'une telle activité enzymatique limitée n'est pas nécessairement une preuve de la persistance d'une activité fonctionnelle donnée (ici, le pompage de l'eau hors de la cornée) ni même de la survie de la cellule (53).

Ce d'autant moins dans le cas de la congélation qu'on a pu montrer sur des solutions d'enzymes, l'accélération de certaines réactions biochimiques par le froid (42).

Pratique,

La reproductibilité de la méthode semble assez aléatoire (95). Elle exige en tous cas une grande minutie dans le réglage de la technique, malgré laquelle on trouve encore trop souvent des résultats paradoxaux.

Sa sensibilité est assez faible : on n'a pu obtenir sur plusieurs séries de cornées de plus en plus altérées, une gradation franche et facilement reconnaissable du degré de coloration.

Enfin, comparée aux colorations vitales classiques on a trouvé

- une marge d'incertitude relativement grande (171) : à partir de quel degré de coloration (ou de décoloration) une cellule doit-elle être considérée comme altérée ?
- des résultats discordants : des cellules imperméables au vert Lissamine et à activité micro-cinématographique normale se colorent tout de même au N.B.T., (par la méthode de O'Neill) (55)

Si bien que cette méthode ne nous semble finalement applicable que sur d'assez grandes séries. Ses résultats semblent alors parallèles à ceux des colorations vitales classiques et des cultures de tissus (172). Finalement, nous ne pensons pas qu'on puisse donner à cette seule méthode une valeur absolue dans la détermination de la viabilité et du fonctionnement cellulaire.

II. - LES CULTURES DE TISSUS.

1/ Technique et résultats.

Deux méthodes ont été employées pour tester la vitalité cellulaire, dont l'une est une culture vraie, l'autre plutôt l'observation de la survie des cellules en milieu vivant.

a) La culture de tissus in vitro.

Son application à l'étude de la survie des cellules de la cornée a fait l'objet d'assez nombreux travaux.

La plupart des auteurs cultivent les cellules de la cornée à partir d'explants placés en coagulum de plasma, ne considérant que l'épithélium et les fibroblastes du stroma. Mc Pherson et coll. (90), Draheim et coll. (30-31), Cockeram et coll. (23 bis) ont montré que les cellules étaient capables de se multiplier en culture après trois semaines de conservation à + 4° en chambre humide, et jusqu'à 1 mois en huile minérale.

Stocker et coll. (168-169), puis A. Smith et coll. (160) ont mis au point des procédés de séparation des différentes couches de la cornée, en s'intéressant particulièrement à l'endothélium. Le pouvoir de multiplication des cellules endothéliales peut résister jusqu'à 5 semaines de conservation des cornées en huile minérale à + 4°.

Des trois tissus de la cornée l'endothélium semble toutefois le moins résistant à la conservation en ce qui concerne son potentiel de culture in vitro.

b) La "culture" sur membrane chorio allantoïdienne de l'oeuf de poule.

Proposée par Basu et coll. (8 bis), l'implantation sur membrane chorio-allantoïdienne de fragments de cornée a été utilisée par ces auteurs pour observer la survie de l'épithélium après conservation : le critère de survie est ici le pouvoir de multiplication des cellules de l'épithélium préalablement traumatisé : le test est encore positif après 15 jours de conservation en chambre humide à + 4°, 21 jours en paraffine.

La méthode a été reprise et modifiée par de Ocampo et coll. (120), qui l'applique soit au stroma, soit à l'endothélium.

Le principe de sa méthode est le suivant : après implantation dans l'oeuf, les cellules cornéennes qui étaient mortes disparaissent en 48 heures (et ce, même si l'examen histologique simple en semblait normal), alors que les cellules vivantes au moment de l'implantation persistent. On compare donc le nombre de cellules par champ de microscope avant et après implantation sur la membrane chorio-allantoïdienne. Les valeurs trouvées pour l'endothélium de cornées conservées à + 12°C (globes entiers) sont indiquées au tableau (2).

TABLEAU (2)

Délai après la mort du donneur	Nombre de cellules trouvées par champ de microscope			
	HOMME		LAPIN	
	Avant implantation sur MCA	48 h après implantation sur MCA	Avant implantation sur MCA	48 h après implantation sur MCA
1 heure			38	36
3 heures	30	23		
5 heures	30	20		
6 heures			38	28
8 heures			38	14
9 heures	30	16		
12 heures	30	10		
18 heures			38	8
19 heures	30	<5		
20 he.	30	0		
24 heures			38	<3

Les kératocytes, comptés selon ce même principe, semblent beaucoup plus résistants.

Expérience personnelle.

Dans notre laboratoire, Mme Bronstein a mis au point un procédé de culture sur verre des cellules endothéliales séparées par trypsinisation.

Elle a obtenu ainsi régulièrement

- des cultures en couche mono-cellulaire à partir des endothéliums frais,
- des cultures endothéliales à partir de cornées conservées à + 4° pendant 10 jours.

Critique.

a) La culture de tissus in vitro.

Il semble donc bien que la viabilité des cellules cornéennes, et en particulier des cellules endothéliales soit très résistante à la conservation, dans la mesure où l'on admet comme test de viabilité le pouvoir de se multiplier en culture. Il est fort possible que cette multiplication se fasse en réalité à partir d'un très petit nombre de cellules ayant conservé leur potentiel de reproduction.

Ainsi ne peut-on guère considérer la culture in vitro comme un test satisfaisant pour juger d'une intégrité de l'endothélium suffisante pour une kératoplastie transfixiante, dans la mesure où elle ne rend compte

- ni du pourcentage de cellules conservées à partir desquelles s'est fait la multiplication,
- ni surtout de la valeur fonctionnelle de ces cellules, absolument indispensable pour la kératoplastie.

Il pourrait être intéressant d'étudier certaines activités métaboliques de ces cellules en culture.

b) La "culture" sur membrane chorio allantoidienne.

Le test proposé ici

- n'apprécie plus le pouvoir de multiplication, mais en quelque sorte le pouvoir de survie des cellules.
- il permet une expression chiffrée et graduée en pourcentage de cellules survivantes,
- il semble enfin à la fois très sensible, et d'application pratique relativement simple, et mériterait sûrement d'être au moins essayé pour le

sujet qui nous intéresse, ce que nous n'avons encore pu faire jusqu'à maintenant,

- Il ne représente cependant évidemment pas un test des capacités fonctionnelles des cellules.

III. - TESTS PHYSIOLOGIQUES DIVERS.

Ils permettraient une étude plus dynamique du fonctionnement cellulaire. La majorité d'entre eux n'a cependant pas encore été mise au point pour l'endothélium cornéen.

1/ L'incorporation de radio-éléments.

Recherchée in vitro sur la cellule conservée, elle utilise essentiellement la thymidine tritiée qui entre dans la synthèse de l'ADN. Son incorporation implique donc que les cellules conservées gardent leurs possibilités de replication de l'ADN, c'est-à-dire de multiplication cellulaire.

L'application pratique reste cependant difficile :

- il s'agit d'une technique minutieuse, difficile et coûteuse, exigeant un appareillage complexe, et des compétences très précises. De plus, cette technique a été essentiellement mise au point pour des cellules isolées en suspension. Dans le cas particulier de l'endothélium cornéen il faudrait caractériser l'incorporation par autoradiographie, et non par comptage, pour apprécier l'importance de la fixation endothéliale à l'exclusion de celle des autres couches de la cornée.
- par ailleurs, on sait que dans les conditions normales, l'endothélium cornéen se reproduit excessivement peu (les cellules endothéliales marquées in vivo à la thymidine tritiée et laissées en place sont retrouvées au moins 6 mois après le marquage (48). Or ce marquage ne peut se faire qu'à l'occasion de la division cellulaire qu'il faut donc provoquer artificiellement

- . soit par lésion de l'endothélium,
- . soit par mise en culture

toutes manoeuvres qui modifient le comportement des cellules.

- enfin ici encore, on ne peut affirmer que ces cellules capables de reproduction seront nécessairement capables de remplir leur rôle fonctionnel. Il faudrait pour cela chercher l'incorporation d'un élément connu impliqué dans l'activité métabolique que l'on veut tester, ce qui dépasse les connaissances actuelles.

2/ La mesure de la consommation d'oxygène par la méthode de Warbourg est utilisée couramment pour d'autres cellules (155), et a été adaptée pour l'ensemble de la cornée (1-32-140), où le stroma joue un rôle quantitativement majeur, mais non pour l'endothélium seul, pour lequel on devrait mesurer des quantités infinitésimales, en deçà des possibilités techniques actuelles.

3/ Les dosages biochimiques divers explorant l'activité métabolique de l'endothélium seraient probablement intéressants, mais exigent également la mise au point de techniques minutieuses et précises. Ils ont été expérimentés pour :

- les lactales dans l'épithélium cornéen (144-177). Le taux semble en être plus stable après conservation des cornées isolées que du globe entier.
- différents enzymes dans les différentes couches cornéennes (163). Les résultats en sont variables avec l'enzyme envisagé, le mode de conservation et le tissu exploré : dans l'ensemble, les enzymes de l'épithélium seraient plus sensibles à la durée de conservation, ceux de l'endothélium et du stroma, au type de conservation.

Ici encore, il faudrait doser une multitude de produits pour avoir une image à peu près complète de l'état métabolique de la cellule, ou connaître suffisamment bien la physiologie de la cellule endothéliale, pour savoir quelles sont les substances plus particulièrement en rapport avec une activité métabolique donnée.

4/ Enfin l'appréciation des propriétés physiques des cellules, telles la conductibilité électrique (95)
les propriétés des membranes (155)

a été utilisée pour d'autres tissus, et serait probablement ici d'un intérêt majeur : permettant peut-être d'analyser directement les propriétés physiologiques de l'endothélium essentielles à son bon fonctionnement après kératoplastie, et qui sont en rapport avec sa perméabilité aux ions.

5/ Tous ces tests n'ont pu être étudiés dans le cadre de ce travail élémentaire. Certains d'entre eux au moins représentent probablement, sinon une solution unique et complète au problème de l'appréciation de la validité de l'endothélium cornéen, du moins un appoint non négligeable aux méthodes employées jusqu'ici. Ils exigeront évidemment une mise au point qui risque d'être longue.

IV. - KERATOPLASTIE EXPERIMENTALE.

C'est finalement une méthode de contrôle indispensable, dans la mesure où elle est justement le but que se propose la conservation de cornée.

1/ La technique comporte deux temps :

a) La technique opératoire, variable avec l'animal d'expérience, chacun posant ses problèmes propres. Les animaux les plus employés sont le lapin, le chien et le chat (4-22-105-106-123-150).

b) La surveillance du greffon,

- Clinique, par examen quotidien, puis bi-hebdomadaire à la lampe à fente, notant l'aspect de la cornée réceptrice et du greffon : (degré d'oedème, d'opacification, aspect de la Descemet), les modifications de la Chambre Antérieure : (exsudats, synéchies, hémorragies). On comparera ainsi l'évolution des greffons conservés à celle des greffons frais.
- Histologique, sur une série de kératoplasties faites dans des conditions identiques, par prélèvement du globe à intervalles variables après la greffe, et examen histologique de l'endothélium. Plus intéressant que l'examen histologique simple est le repérage de l'origine (donneur ou receveur) des cellules endothéliales, qui peut se faire

. soit par marquage préalable de l'un des deux in vivo par la thymidine tritiée (48-82-95-139),

. soit par repérage des chromatines sexuelles (9-36-82-94).

2/ Résultats.

Les expériences antérieures semblent concorder sur la persistance prolongée des cellules endothéliales du donneur dans les greffons restés clairs. Persistance qui serait de l'ordre de 6 mois à 2 ans.

3/ Expérimentation personnelle.

- Une expérimentation antérieure faite dans le même laboratoire par R. Sicault (156 bis) a permis de mettre au point une technique satisfaisante de kératoplastie transfixiante chez le lapin, obtenant, sur une série de 36 autogreffes, 34 greffons clairs après 2 mois d'évolution.
- Sur une nouvelle série de 60 homogreffes faites chez le lapin dans les mêmes conditions techniques, J.A. Bernard (11 bis) a trouvé, au cours d'une double surveillance clinique et anatomopathologique

. 50 % de greffons clairs, l'examen anatomo-pathologique d'échantillons de cette série montrant un aspect satisfaisant de l'endothélium du greffon.

. 50 % de greffons opacifiés, dont la moitié montraient des signes histologiques de rejet immunologique, l'aspect de l'autre moitié étant plus difficile à identifier avec certitude.

- Enfin il a été fait une série préliminaire de 12 homogreffes transfixiantes avec marquage préalable in vivo de la cornée du donneur ou du receveur par la thymidine tritiée, suivant la technique décrite par Polack (139) un peu modifiée :

. cryocoagulation préalable par application d'azote liquide sur la cornée durant 15 secondes,

. injection de Thymidine Tritiée dans la Chambre Antérieure à partir de la 24ème heure, toutes les 24 heures pendant 4 jours,

. prélèvement de la cornée ainsi marquée trois mois plus tard, pour homogreffe fraîche, ou kératoplastie transfixiante avec un greffon non marqué sur le receveur marqué.

Les cornées ainsi greffées ont été prélevées et examinées par autoradiographie, de mois en mois, entre 1 et 12 mois après la kératoplastie.

- L'interprétation s'est avérée difficile, dans la mesure où la congélation préalable de la cornée du donneur donnait une poussée artificielle à la multiplication cellulaire, mais aussi fragilisait l'endothélium, ce qui faisait un receveur de mauvaise qualité.

Dans l'ensemble, cependant ,

- dans les greffons restés clairs, on a retrouvé des cellules endothéliales du donneur, surtout dans la région centrale. La région périphérique était occupée par une migration des cellules du receveur.
- dans les greffons opacifiés, on n'a retrouvé que quelques cellules du donneur disséminées çà et là.

Mais notre expérience n'est pas suffisante pour permettre une conclusion définitive

4/ Critique.

Elle trouve place aux deux stades de l'expérimentation.

a) La première

est faite sur des animaux (lapins, chiens, chats) d'où le

le passage à la kératoplastie humaine apporte nécessairement une inconnue non négligeable. Chez le lapin, par exemple la "repousse" endothéliale à partir de la cornée réceptrice se fait beaucoup plus facilement que chez l'homme. Par ailleurs, la tolérance des tissus à la conservation prolongée varie d'une espèce à l'autre.

D'autre part, on a vu que si sur une série de 36 autokératoplasties chez le lapin, on obtenait un greffon clair dans plus de 90 % des cas, il n'en est pas de même pour les homogreffes, dont le pourcentage de succès tombe à 50 %. Une expérimentation faite avec des greffons conservés (nécessairement homogreffes), exigera donc de très grandes séries pour être significative, puisque déjà 50 % des greffons frais s'opacifient dans ces conditions pour des raisons immunologiques.

b) La surveillance

Clinique, à la lampe à fente, est souvent d'interprétation fort difficile, le rejet, l'accident infectieux, la réaction inflammatoire pure, se manifestant par des signes cliniques très semblables (oedème, précipités et plis Descemetiques) avant l'opacification du greffon.

Anatomopathologique, (avec ou sans marquage radio isotopique). Ici encore, on a vu que les modifications étaient rarement assez tranchées et univoques pour permettre une interprétation simple et certaine. Ici encore c'est en partie par le grand nombre d'observations qu'il faudra compenser cette incertitude.

EN CONCLUSION.

Il nous a semblé que chacune de ces méthodes de contrôle

- à condition d'être pratiquée avec beaucoup de minutie, un maximum possible de standardisation, et sur de grandes séries
- apportait un type, et un seul, de renseignements, dont aucun ne peut à lui seul être considéré comme suffisant pour décider de la validité d'un greffon.

C'est en combinant différentes méthodes, pour réunir d'abord une observation morphologique (histologie classique, et si possible ultra structure), un test de fonctionnement qui nous semble encore à mettre au point, et surtout la kératoplastie expérimentale avec repérage des cellules du donneur et du receveur, que l'on pourra se faire une idée de la valeur d'une méthode de conservation. Dans cet ensemble, l'examen histologique pourrait représenter le premier test d'appréciation relativement simple et rapide, applicable tout au long d'une expérimentation. La kératoplastie, qui est finalement le but qu'on se propose donnant, avec le repérage des cellules, qui nous semble indispensable, la réponse définitive.

CONGELATION

La question de l'existence possible d'une vie latente remonte au début du XVIIIème siècle à l'occasion de l'observation de Leeuwenhook sur les Rhotifères capables de reviviscence après dessèchement. Plus tard, P. Becquerel découvrit que ces organismes gardaient leur pouvoir de reviviscence, si on ajoutait à la dessiccation l'exposition aux très basses températures, voisines du zéro absolu, et auxquelles les phénomènes métaboliques semblent effectivement impossibles. Ce qui amenait P. Becquerel à conclure qu'il s'agissait bien, non d'un ralentissement, mais d'une suspension provisoire de la vie.

Enfin, c'est relativement récemment qu'on s'est avisé que les cellules de mammifères étaient également capables d'une telle anabiose après exposition aux très basses températures. Mais comme elles ne supportent pas la dessiccation préalable, il a fallu trouver d'autres moyens de les protéger contre les méfaits du refroidissement lui-même, dus surtout à la présence de l'eau dans les cellules, et aux modifications qu'elle subit au cours de la congélation. Ainsi sont apparus deux facteurs essentiels :

- la vitesse de congélation et de dégel,
- les agents cryoprotecteurs.

Nous verrons donc successivement :

- L'état actuel des connaissances concernant
 - . le mode de toxicité de la congélation,
 - . le rôle de la vitesse de congélation,
 - . le mode d'action des cryoprotecteurs.
- Les modalités de congélation employées jusqu'à maintenant, et les résultats obtenus sur la cornée,
- Nos propres expériences de congélation de cornée.

I. - LESIONS CREEES PAR LE FROID - LEUR PREVENTION.

On a pu constater sur différents types de cellules vivantes, et par différentes méthodes d'investigation, l'apparition d'altérations cellulaires lors de l'exposition aux très basses températures. Nous n'en citerons que quelques exemples :

1/ Modifications morphologiques.

- l'étude au microscope ordinaire sur les myofibrilles de cornes utérines de cochon d'Inde (39), et sur les cellules hépatiques du rat (41) a montré des modifications

- . cytoplasmiques : oedème, granulations, vacuoles,
- . nucléaires : pyknose,
- . et surtout des membranes cellulaires

- l'examen en ultra microscopie (39-156) a mis en évidence des altérations des membranes.

2/ Modifications métaboliques, mises en évidence par l'étude de

- la reproductibilité (155) sur les levures,
- des débits respiratoires (155)
- des modifications enzymatiques qui, dans les cellules végétales (53) semblent porter surtout sur les enzymes fixés sur des particules, et pourraient donc être liées à des modifications des membranes de ces particules. Par ailleurs, ces modifications enzymatiques ne s'accompagnent pas nécessairement de mort cellulaire. Enfin, sur des homogenats de produits métaboliques, certaines réactions enzymatiques pourraient être accélérées par le froid (42) autour de -20° .

Toutes ces altérations cellulaires dues au froid varient considérablement avec les modalités de la congélation. D'où l'intérêt de connaître dans un premier temps les modifications physico-chimiques imposées aux solutions physiologiques par les phénomènes thermiques du refroidissement et du réchauffement, et qui expliquent, en partie au moins, les phénomènes biologiques constatés.

A - Modifications subies par les solutions biologiques au cours des variations thermiques.

Elles ont été étudiées, notamment par B.J. Luyet, et Louis Rey. On peut les classer, avec ce dernier, suivant la tranche de tempé-

ratures dans laquelle elles apparaissent.

1) Entre 0 et 20° C, trois phénomènes sont à noter :

a) L'apparition de cristaux de glace, formés de glace pure,

- apparaissant à une température variable suivant les conditions. Dans un système capillaire, l'eau pure ne commence à cristalliser qu'à une température inférieure à 0°, c'est le phénomène de surfusion. Or, à l'intérieur des cellules vivantes, les très grande compartimentation de l'eau crée pratiquement un tel système capillaire,
- la vitesse de développement des cristaux est fonction du degré de surfusion atteint (croissant avec lui) et de la composition du milieu (d'autant plus lente que la concentration en solutés est plus grande),
- enfin, la cristallisation est d'abord extra-cellulaire, puis seulement intra-cellulaire, avec un retard plus ou moins grand.

b) L'augmentation de concentration de la solution. Du fait que la cristallisation porte sur l'eau pure, celle-ci est soustraite au mélange resté en solution, qui sera donc nécessairement plus concentré. Le phénomène étant d'abord extra-cellulaire, il s'en suit une hyperosmolarité extra-cellulaire, et une déshydratation cellulaire.

c) Modification des réactions enzymatiques. Elle est due probablement, au moins en partie à une modification de configuration des molécules protéiques, entraînant un défaut de coaptation entre enzyme et substrat. Cette perturbation peut atteindre à des degrés divers les différentes étapes d'une même chaîne, d'où un déséquilibre accumulant certains métabolites intermédiaires normalement transitoires, et qui risquent de se montrer toxiques lors du réchauffement.

2) Entre - 20° C et - 80° C = le phénomène eutexique.

A - 20°, le milieu biologique n'est pas encore totalement solidifié ; il se compose d'un mélange en proportions inégales, de glace pure et d'une solution très hypertonique. La cristallisation de l'eau pure en glace continue encore progressivement, concentrant de plus en plus la solution restante, jusqu'à une température critique : le point d'eutexie. A ce point, le mélange liquide restant se solidifie brutalement en cristaux eau-soluté. Si l'on a affaire, par exemple, à une solution de ClNa , on aura brusquement formation de cristaux $\text{ClNa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Dès lors le milieu est entièrement solide, constitué dans le cas envisagé ici d'un mélange hétérogène de cristaux de glace pure et de cristaux de $\text{ClNa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ soigneusement entremêlés : c'est le mélange eutectique.

Pour une solution donnée, la température eutectique de solidification, lors du refroidissement est variable d'une expérience à l'autre, l'eutectique pouvant rester plus ou moins longtemps en surfusion. Par contre, lors du réchauffement le point de fusion de l'eutectique est toujours le même, pour une solution donnée.

3) Entre - 80° C et - 180° C : la vitrification. Si une solution est refroidie suffisamment vite jusqu'à - 120°, elle peut dans certains cas rester en surfusion, échappant à la cristallisation. A partir de - 120°, elle va coaguler en masse amorphe, aboutissant à un état particulier et mal défini : l'état vitreux. Les molécules y seraient disposées de façon irrégulière dans les 3 dimensions, réunies par des liaisons de forces inégales entre elles, et qui ne vont ni se former (au refroidissement) ni lâcher (au réchauffement) toutes ensemble (52).

L'état vitreux est caractérisé (87) par une très faible motilité des molécules, capables seulement de vibration, mais aussi par une grande instabilité ; et le réchauffement progressif, accroissant la liberté moléculaire amène successivement

- la transformation vitreuse : où les molécules seraient capables de rotation et de translation (son apparition se situe environ à - 130°),
- la dévitrification, qui va leur permettre de s'organiser en cristaux. Cette cristallisation apparaît en général à une température un peu supérieure au point eutectique. Elle peut être progressive ou très brutale.

B - Retentissement sur la cellule de ces variations physico-chimiques.

Elles risquent, au cours de la congélation, d'entraîner des lésions cellulaires par différents mécanismes

1) Traumatisme mécanique par formation de cristaux de glace intra-cellulaires (96-148).

2) Modifications ioniques : la concentration progressive du liquide extra-cellulaire peut entraîner :

- une altération des membranes cellulaires - (39-96)
- une déshydratation cellulaire et un choc osmotique (96-148)

3) Traumatisme thermique : les modifications brutales de températures peuvent entraîner directement des lésions cellulaires par " choc thermique " (148), terme peu précis traduisant l'ignorance où l'on est du mécanisme de cette intolérance.

C - Moyens de réduction des phénomènes dangereux pour la cellule.

1) Régulation de la courbe de refroidissement

a) Durant la 1ère phase : un refroidissement très rapide

. limite la durée de la phase de cristallisation d'eau pure extra-cellulaire, donc de contact des cellules avec un milieu hypertonique, et de déshydratation intra-cellulaire.

. prolonge la durée de la surfusion et diminue la taille des cristaux,

. mais risque également de provoquer une cristallisation intra-cellulaire nocive, l'eau n'ayant pas le temps de quitter les cellules avant que le front de cristallisation ne les ait gagnées.

Finalement, il s'agit de trouver la vitesse de refroidissement optima entre les deux extrêmes dangereux (96). Cette vitesse semble bien être spécifique à chaque espèce de cellules, et doit être trouvée expérimentalement pour un tissu donné, même si la vitesse de: 1°/minute (1 degré/minute) s'est avérée correcte dans beaucoup de cas.

b) Durant la 2ème phase : un refroidissement très rapide permettra d'atteindre rapidement le point eutexique.

c) Enfin, pour atteindre la vitrification aux très basses températures, sans cristallisation importante préalable, il faut également un refroidissement très rapide jusqu'à - 130° C au moins. Il ne faut pas oublier cependant le risque de choc thermique lié à un refroidissement trop brutal.

2) Régulation de la vitesse de réchauffement

Si une solution a été refroidie assez rapidement pour obtenir un état vitreux, ou pour réduire au minimum la taille des cristaux, un réchauffement lent favorisera au maximum (96) au fur et à mesure que la température du mélange remonte:

- d'abord la dévitrification et l'apparition de cristaux dans les températures intermédiaires,

- puis la recristallisation aux températures plus hautes : les plus petits cristaux fondent au profit des plus gros, qui grossissent encore (87).

Ainsi un réchauffement rapide d'un bout à l'autre semblerait-il souhaitable.

3) Les cryoprotecteurs.

Rey a étudié systématiquement l'action des cryoprotecteurs sur les différentes étapes de la congélation des solutions biologiques.

Son expérimentation (145) a été faite essentiellement avec le glycérol.

a) Durant la 1ère étape du refroidissement

- le protecteur agit sur la formation de la glace

- . il diminue la taille, donc les effets traumatiques des cristaux
- . il augmente la viscosité de la solution, ce qui retarde le début de la cristallisation. Or, cette cristallisation s'accompagne d'un dégagement de chaleur, qui risquerait d'élever de nouveau la température du milieu jusqu'au point de fusion, et de retarder la propagation de la congélation, donc de prolonger la durée de ce phénomène (45). Si la température de début de la congélation est suffisamment basse, cet accident sera évité. Ainsi obtiendra-t-on une congélation ultra-rapide, réduisant la durée des modifications ioniques et osmotiques toxiques pour les cellules.

- le protecteur limite la formation de glace en établissant des liaisons avec les molécules d'eau, qui sont ainsi soustraites à la cristallisation (2-39). Ainsi la concentration ionique extra-cellulaire est-elle moindre. Par contre, pénétrant dans les cellules, où la cristallisation est plus tardive, les protecteurs y augmentent l'osmolarité. Ce double mécanisme tend à limiter le déséquilibre osmotique entre milieu intra et extra-cellulaire. Le protecteur sera donc évidemment d'autant plus efficace qu'il pénétrera plus rapidement dans les cellules.

b) Entre - 20° C et - 80° C

Le glycérol régularise la courbe de congélation du mélange eutectique, rend donc prévisible le point d'eutexie et facilite la programmation de la congélation.

c) Enfin, aux très basses températures

le protecteur favorise la vitrification (52-142), probablement en créant des groupements plus ou moins complexes entre les molécules de protecteur et d'eau, reliés entre eux par des forces inégales.

Cependant toutes ces constatations expérimentales macroscopiques n'apportent très probablement qu'une explication partielle du rôle des protecteurs cellulaires, dont le mécanisme biochimique intime d'action sur la cellule reste inexpliqué. On a invoqué le rôle de

- la formation de liaisons Hydrogène, et un protecteur serait d'autant plus efficace qu'il est meilleur accepteur d'hydrogène (26)

- l'action sur la formation de liaisons S-S. intermoléculaires (2)
- l'action sur les lipoprotéines (78)

Par ailleurs, on a constaté

- un certain parallélisme entre les capacités de protection vis-à-vis du froid, et des radiations ionisantes (6)
- le rôle favorable des protecteurs sur la conservation des solutions d'enzymes (44)

Tous les éléments de connaissance qu'on a pu recueillir jusqu'à maintenant ne sont encore que fragmentaires, et la liaison encore très incomplète entre les caractéristiques biochimiques des protecteurs et leurs propriétés biologiques (141).

Enfin les cryoprotecteurs ont, vis-à-vis des cellules une toxicité propre qui en limite les conditions d'emploi. Cette toxicité dépend du produit considéré, du tissu vis-à-vis duquel elle se développe, et des conditions dans lesquelles ils sont mis en présence.

Ainsi le glycérol

- sera moins toxique que le Diméthylsulfoxyde sur l'épithélium cornéen, plus toxique sur l'endothélium (160).
- pénétrant lentement dans les cellules, il les protégera mieux au cours d'une congélation lente (45). En cas de congélation rapide, n'ayant pas le temps de pénétrer dans les cellules, il augmentera le déséquilibre osmotique dû à la concentration du liquide extra-cellulaire (148).

De façon générale : la toxicité des cryo-protecteurs augmente avec leur concentration et avec la température.

Le Diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.) est le protecteur le plus intéressant actuellement connu pour l'endothélium (84)

- Comme les autres, il est moins toxique aux températures inférieures à 0°, aussi bien sur le tissu cardiaque (66-67), que sur la corne utérine (39) et sur la cornée de lapin (107), encore que certaines expérimentations semblent montrer une bonne tolérance à des concentrations allant jusqu'à 15 % à température ambiante (111), par injection intra-caméculaire.

- Pénétrant très rapidement dans les cellules (11), le D.M.S.O. permet une congélation très rapide, limitant la durée de son contact, avec les cellules aux températures d'activité métabolique (45-148). Ceci est d'autant plus nécessaire que la congélation isolant progressivement l'eau sous forme de glace, la concentration du D.M.S.O. dans le milieu resté liquide augmente parallèlement.

II. - METHODES DE CONGELATION DE CORNEES EMPLOYEES JUSQU'A MAINTENANT. RESULTATS.

Deux méthodes semblaient possibles au départ : congélation du globe entier, ou de la cornée isolée.

A. Congélation du globe entier.

Elle a été mise au point et appliquée essentiellement par A.U. Smith et F.O. Mueller (82-105-109-111-158).

Technique.

- Tout de suite après le prélèvement du globe, la Chambre Antérieure est irriguée par une solution de D.M.S.O. à 7,5 % ou 14 %, en sérum salé isotomique, en sérum homologue, ou en un mélange à parts égales de sérum homologue et de milieu Parker 199. Cette irrigation se fait avec une aiguille spéciale à trous latéraux, qui permet un vrai lavage de la Chambre Antérieure avec le liquide protecteur.

- Puis le globe est scellé dans une ampoule de verre, avec une solution protectrice qui peut être soit de même composition que celle qui a servi à irriguer la Chambre antérieure, soit une solution de glycérol à 10 %.

- L'ampoule est placée dans une enceinte que l'on refroidit progressivement à - 79°C. Le refroidissement est relativement lent, et il n'y a pas de contrôle de la courbe thermique dans l'ampoule, ni dans la Chambre Antérieure.

- La conservation se fait à - 79° C.

- La décongélation est rapide, en plongeant l'ampoule dans l'eau chaude, puis l'ampoule est brisée, le globe extrait et lavé, la cornée prélevée et greffée.

- Le contrôle de la validité du greffon a été assuré par la kératoplastie elle-même avec surveillance clinique, et dans un certain nombre de cas, repérage des chromatines sexuelles des cellules endothéliales du greffon.

- Cette expérimentation faite d'abord sur le lapin a été ensuite appliquée à l'homme.

Résultats.

a) Chez le lapin : l'injection dans la Chambre Antérieure du globe donneur, d'une solution de D.M.S.O. à 7,5 % ou 14 %, à température ambiante, avant le prélèvement du greffon, ne semble guère jouer de rôle péjoratif sur les kératoplasties fraîches : 90 % des greffes de cette série étaient claires après 3 semaines, et le restaient après 10 semaines (111)

- de même, la nature du solvant biologique employé pour le D.M.S.O. ne semble guère modifier les résultats des kératoplasties.

- les résultats des contrôles histologiques n'étaient pas absolument univoques. Sur une série de 12 greffons examinés avec repérage des chromatines sexuelles.

- . sur 4 greffons frais : l'endothélium du donneur était retrouvé, et lui seul, sur toute la surface du greffon.

- . sur 4 greffons congelés, l'endothélium du donneur n'était retrouvé que dans la région centrale, la périphérie ayant été réhabilitée par les cellules endothéliales du receveur.

- . sur les 4 autres greffons congelés, l'ensemble de l'endothélium avait été remplacé par celui du receveur.

Il est à noter par ailleurs qu'un certain nombre de ces greffons sont passés cliniquement par un stade d'oedème prolongé, voire d'opacification, qui n'a cédé qu'après plusieurs semaines (8 à 12), sans qu'on puisse établir de parallélisme très exact entre les faits cliniques et les constatations histologiques. On peut se demander cependant, si un tel phénomène ne correspond pas au remplacement de l'endothélium greffé par la repousse à partir de l'endothélium du receveur.

- la durée de conservation semble jouer à - 79° un rôle majeur : les résultats cliniques, bons ou passables après moins de 2 mois de conservation deviennent franchement mauvais au-delà (105)

b) Chez l'homme, sur une série de 10 kératoplasties faites pour des causes diverses, 5 étaient claires après 6 mois, ce qui ne permet pas de conclure.

Dans notre laboratoire,

une expérimentation faite par J-P Faure sur le lapin (40) est une variante simplifiée de celle de Mueller :

- après l'injection de liquide protecteur dans la Chambre Antérieure,
- les globes étaient plongés directement dans l'Azote liquide.

Mais les résultats des kératoplasties, qui semblaient encourageants au début, se sont avérés décevants à la longue.

Critique de la méthode.

Elle a l'avantage d'être simple et d'éviter les manipulations traumatisantes pour la cornée.

Mais l'injection dans la Chambre Antérieure du protecteur entraîne une dilution importante et non contrôlable de ce dernier. Après lavage de la Chambre Antérieure avec une solution de D.M.S.O. à 14 %, une ponction avec analyse du liquide ramené a trouvé une concentration de D.M.S.O. de 2 % seulement. L'aiguille spéciale employée par Muller permet un meilleur lavage, mais reste un moyen approximatif, ne permettant pas de dosage rigoureux.

Par ailleurs, du point de vue thermique, le globe représente une masse inerte considérable, jouant le rôle d'accumulateur thermique, et retardant les variations de température au niveau de la cornée, ce qui entraîne

- à la congélation : un mauvais contrôle de la courbe de refroidissement,
- au réchauffement : un ralentissement très nocif.

Ainsi en est-on venu à congeler la cornée isolée.

B. Congélation de cornée isolée.

Elle a été faite essentiellement par 2 équipes : Capella et Kaufman d'une part, Mueller et Coll. d'autre part, utilisant des méthodes proches mais non identiques.

1) L'expérimentation de Capella (17)

a porté sur des cornées de lapin, de chat et d'homme, avec contrôle de la viabilité de l'endothélium, par coloration enzymatique au NBT (2ème méthode décrite plus haut) et par kératoplastie.

La méthode de congélation adoptée comporte

- Trempage des cornées immédiatement après prélèvement, à 0°, dans 4 solutions à concentration de D.M.S.O. croissantes de 2

à 7,5 %. La nature du solvant employé (sérum homologue ou liquides artificiels divers) ne semblait pas jouer de rôle déterminant dans le résultat. La solution adoptée était sérum homologue + sucrose. La cornée était laissée 10 minutes dans chaque solution.

- Immersion de la cornée, endothélium vers le haut, dans un tube en verre, avec 1 cc de la solution protectrice n° 4, ce volume s'étant avéré le plus favorable à la conservation de l'endothélium lors de la congélation.

- Refroidissement dans un congélateur à azote liquide (chaque tube de verre étant placé dans un récipient en plastique). La courbe de refroidissement finalement choisie était : 2°/minute jusqu'au point de cristallisation (- 14° C), où se fait le dégagement de chaleur, qui ramène la température du liquide à -9° C. Après cette remontée thermique, la vitesse de refroidissement est un peu accélérée : 2°65/minute, jusqu'à - 80° C. Puis le récipient contenant les cornées est placé dans un container d'azote liquide à -190° C. Le respect du plateau dû au dégagement de chaleur semblait important pour la bonne conservation de l'endothélium. La température de -14° C n'était de nouveau atteinte qu'au bout de 10 minutes au moins.

- Le réchauffement se faisait en plaçant le tube de verre dans un bain d'eau chaude, jusqu'à ce qu'il ne reste plus dans le tube de verre qu'un tout petit glaçon. La cornée était alors sortie et rincée dans du sérum dépourvu de D.M.S.O.

Les résultats des contrôles par coloration au NBT et par kératoplastie, aussi bien chez le lapin que chez l'homme, semblaient satisfaisants.

Une série de kératoplasties humaines faites un peu plus tard par la même équipe, avec les mêmes procédés semblaient montrer des résultats cliniques aussi satisfaisants qu'avec du matériel frais (74), même lors de kératoplasties faites pour kératopathie bulleuse (70).

2) L'expérimentation de Mueller a été faite d'abord sur chiens (106-107-111-123), puis sur l'homme (109-110-123).

La méthode est un peu différente de la précédente.

- Le liquide employé pour les solutions de D.M.S.O. était un mélange à parts égales de sérum de veau, et de milieu Parker 199.
- Les cornées étaient plongées directement à + 2°C dans la solution définitive, sans passage préalable dans des solutions plus diluées. Les concentrations de D.M.S.O. essayées allaient de 7 % à 14 %.
- Les cornées étaient placées dans un tube métallique, sans interposition de tube de verre. Les essais faits avec

différents volumes de liquide dans le tube avaient montré ici les meilleurs résultats en ne laissant aucun liquide dans le tube métallique, le "trempage" de la cornée durant 5 à 10 minutes suffisant à donner une inhibition efficace.

- Les contrôles de viabilité étaient faits par coloration au NBT suivant la technique de Mueller, (1ère méthode décrite plus haut) et par kératoplastie.

Résultats.

a) Tolérance au D.M.S.O. Elle a été testée par trempage des cornées dans des solutions de D.M.S.O. à concentrations variables, pendant des temps et à températures également variables (123). Il en ressortait que :

- . l'endothélium n'est guère sensible à la durée du contact avec le D.M.S.O.

- . Il est très sensible, par contre, à la concentration du produit, et à la température du liquide. Un contact de 5 minutes avec du D.M.S.O. à 6 % à température ambiante suffisait à entraîner des altérations sévères.

Une expérimentation semblable faite sur des cornées de chien, avec congélation à -196°C et réchauffement, a montré que (106-107)

- . le réchauffement de la cornée avec sa solution de D.M.S.O. au-delà de $+2^{\circ}\text{C}$, entraîne des lésions endothéliales étendues (80 % des cellules d'après la coloration au NBT. Les kératoplasties montrent l'apparition à la 2ème semaine d'une membrane rétro-cornéenne, et l'absence totale d'endothélium sur le greffon après un mois).

- . Si on combine réchauffement et dilution de la solution de D.M.S.O., les altérations endothéliales sont moins importantes (60 % des cellules d'après la coloration au NBT)

- . Enfin les meilleurs résultats sont obtenus par congélation de la cornée après "trempage" au D.M.S.O. à $+2^{\circ}\text{C}$, sans liquide environnant. Le réchauffement se fait alors à la chaleur de la main, et en ajoutant 10 ml de mélange sérum de veau + Parker 199 dès que l'ouverture du récipient est possible. Le pourcentage des cellules endothéliales lésées, détectées au NBT tombe alors à 10 à 20 %, et l'évolution des kératoplasties transfixiantes est la même qu'avec des greffons frais.

b) Courbe de congélation (123)

L'enregistrement par thermocouples situés en divers points de l'enceinte de traitement et du récipient contenant les cornées a montré que

- le point d'apparition du dégagement de chaleur se situait environ à -14°C , pour une vitesse de refroidissement de $1^{\circ}/\text{minute}$, et avec une solution de D.M.S.O. à 12 %, que le thermocouple enregistreur soit simplement plongé dans le liquide protecteur, ou piqué dans la cornée. Mais dans le second cas, le dégagement de chaleur est beaucoup plus faible et plus bref.
- Pour une vitesse de refroidissement inférieure à $1^{\circ}/\text{minute}$, le dégagement de chaleur est retardé (vers -20°C) et prolongé. Mais des lésions endothéliales importantes apparaissent dès -5°C .
- La vitesse optima semble être de l'ordre de 1 à $2^{\circ}/\text{minute}$, et l'endothélium semble mieux conservé si on limite la durée du dégagement de chaleur par accélération de la vitesse de refroidissement vers -12°C , soit juste avant le point de cristallisation.

On voit que ces résultats ne sont pas strictement superposables à ceux trouvés par l'équipe de Kaufman.

c) Les résultats de kératoplasties,

faites avec des cornées conservées suivant ce procédé aussi bien chez le chien que chez l'homme étaient satisfaisants. La durée de conservation à -196°C ne semble pas influencer sur la viabilité de l'endothélium.

III. - EXPERIMENTATION PERSONNELLE.

A. Matériel.

Nous avons utilisé, pour refroidir les cornées, un appareillage Inotherm, mis au point pour nous, et comportant :

1) une enceinte de traitement isotherme, reliée par un tuyau flexible à un réservoir d'azote liquide de 130 litres. A l'entrée de l'enceinte, l'arrivée d'Azote liquide est réglée par une vanne dont l'ouverture et la fermeture peuvent être commandées soit manuellement, soit de façon automatique par le programmeur, suivant les exigences de la courbe de refroidissement donnée à celui-ci.

La diffusion de l'azote vaporisé dans cette enceinte est assurée par une turbine. On obtient ainsi une température à peu près homogène dans l'ensemble de l'enceinte, contrôlée par un thermocouple situé à sa partie moyenne et relié à enregistreur : c'est le couple n° 1.

Enfin, une grille placée à mi-hauteur de l'enceinte est destinée à recevoir les boîtiers métalliques contenant les cornées.

2) Un programmeur, muni d'une cellule photo-électrique, reçoit la courbe de refroidissement que l'on veut obtenir. Il est relié au thermocouple n° 1 de l'enceinte et à la vanne d'admission de l'azote. Il règle donc la température de l'enceinte.

3) Un appareil enregistreur est relié à 3 thermocouples

- N° 1 déjà vu
- N° 2 qui mesure la température d'ambiance à l'intérieur d'un boîtier métallique contenant une cornée
- N° 3, au contact même de la cornée.

4) Les cornées sont placées dans des boîtiers en aluminium cylindriques 3 cm x 5 cm, fermés par une capsule plastique. L'un de ces boîtiers est muni de deux thermocouples N° 2 et N° 3. Il contient la cornée témoin.

B. Méthodes.

1) Prélèvement des cornées.

Nous avons utilisé des cornées de lapins adultes, tués par embolie gazeuse, avec énucléation immédiate, et prélèvement de la cornée avec un anneau de sclère, qui est placé dans du sérum homologue, et utilisé dans l'heure qui suit.

2) Incubation du D.M.S.O.

Nous avons utilisé la technique de Kaufman : trempage des cornées dans 4 solutions successives de D.M.S.O. à concentration croissante. La station dans chaque solution était de 10 minutes, dans un bain de glace maintenant la température à + 4° C.

Les stocks de solutions étaient préparés à l'avance : pour

40 ml

	Solut. 1	Solut. 2	Solut. 3	Solut. 4
Sérum lapin (ml)	39	38,4	37,6	37
D.M.S.O. pur pour chromatographie gazeuse (ml)	0,8	1,6	2,4	3,0
Sucrose (gr)	1	2	3	4

Ces stocks étaient gardés au frigidaire, sans précautions d'asepsie particulière.

3) Congélation.

Deux modes de congélation ont été employés

- a) Cornée placée dans un tube de verre ou de plastique de 8 mm de diamètre, avec 1 cc de liquide protecteur de la solution N° 4, ce qui permet d'immerger complètement la cornée.

Ce tube est lui-même dans un boîtier métallique à capsule de plastique.

- b) Cornée placée sans aucun liquide, directement dans le boîtier métallique. La cornée repose alors sur un petit treillis métallique fin, concave en haut, pour éviter le plissement de la cornée qui risque d'abîmer l'endothélium.

Les courbes données au programmeur ont été modifiées à la demande, jusqu'à obtenir, pour chaque série de congélations, la courbe désirée au niveau du thermocouple N° 3.

C. Résultats.

1) Courbes de refroidissement.

Entre + 4° C et le point de cristallisation, nous avons obtenu sans trop de peine une chute thermique régulière au niveau du couple N° 3, de environ 2°/minute. Dans cette partie, la courbe ne différait guère suivant que la cornée était traitée seule ou avec 1 cc de liquide protecteur.

Le point de cristallisation et le début du dégagement de chaleur se situaient régulièrement plus haut que dans les expérimentations antérieures : le dégagement de chaleur commençait en moyenne à - 9° C, atteignait - 5° C, et la température de - 9° C n'était de nouveau atteinte qu'après 3 minutes en moyenne. La présence ou l'absence de liquide, et la vitesse de refroidissement nous ont semblé peu modifier ce phénomène.

Pour la dernière partie de la courbe, nous avons obtenu ensuite régulièrement et sans difficulté une décroissance thermique régulière de 5°/minute au niveau du couple N° 3.

2) Contrôle des cornées.

- a) Cornées fraîches, non congelées ayant séjourné dans une solution de D.M.S.O. On a choisi des solutions de D.M.S.O. en sérum de lapin à 3 concentrations croissantes : 5 %, 7,5 %, 10 %.

. On a pris 4 lots de 4 cornées à température ambiante,

- le 1er a été laissé 10 minutes dans le D.M.S.O. à 5 %, puis lavé 10 minutes au sérum pur,

- le 2ème a séjourné 10 minutes dans le D.M.S.O. à 5 %
10 minutes dans le D.M.S.O. à 7,5 %
10 minutes dans le D.M.S.O. à 5 %

avant le lavage de 10 minutes en sérum pur.

- pour le 3ème, on a répété la même opération, mais en montant jusqu'à la solution de D.M.S.O. à 10 %,

- enfin le 4ème lot a été utilisé comme témoin.

. La même chose a été faite avec 4 autres lots de 4 cornées, mais à température de la glace fondante.

Le contrôle histologique par coloration au NBT a montré une destruction à peu près totale de l'endothélium après contact avec les solutions de D.M.S.O. à température ambiante. Cette destruction n'était pas retrouvée si la manipulation avait été faite dans un bain de glace.

b) Cornées congelées.

- Examen histologique.

On a retrouvé avec la coloration à l'hématoxyline, comme avec le vert Lissamine, exactement la même gradation de lésions que sur les cornées conservées plus ou moins longtemps en chambre humide à + 4° C.

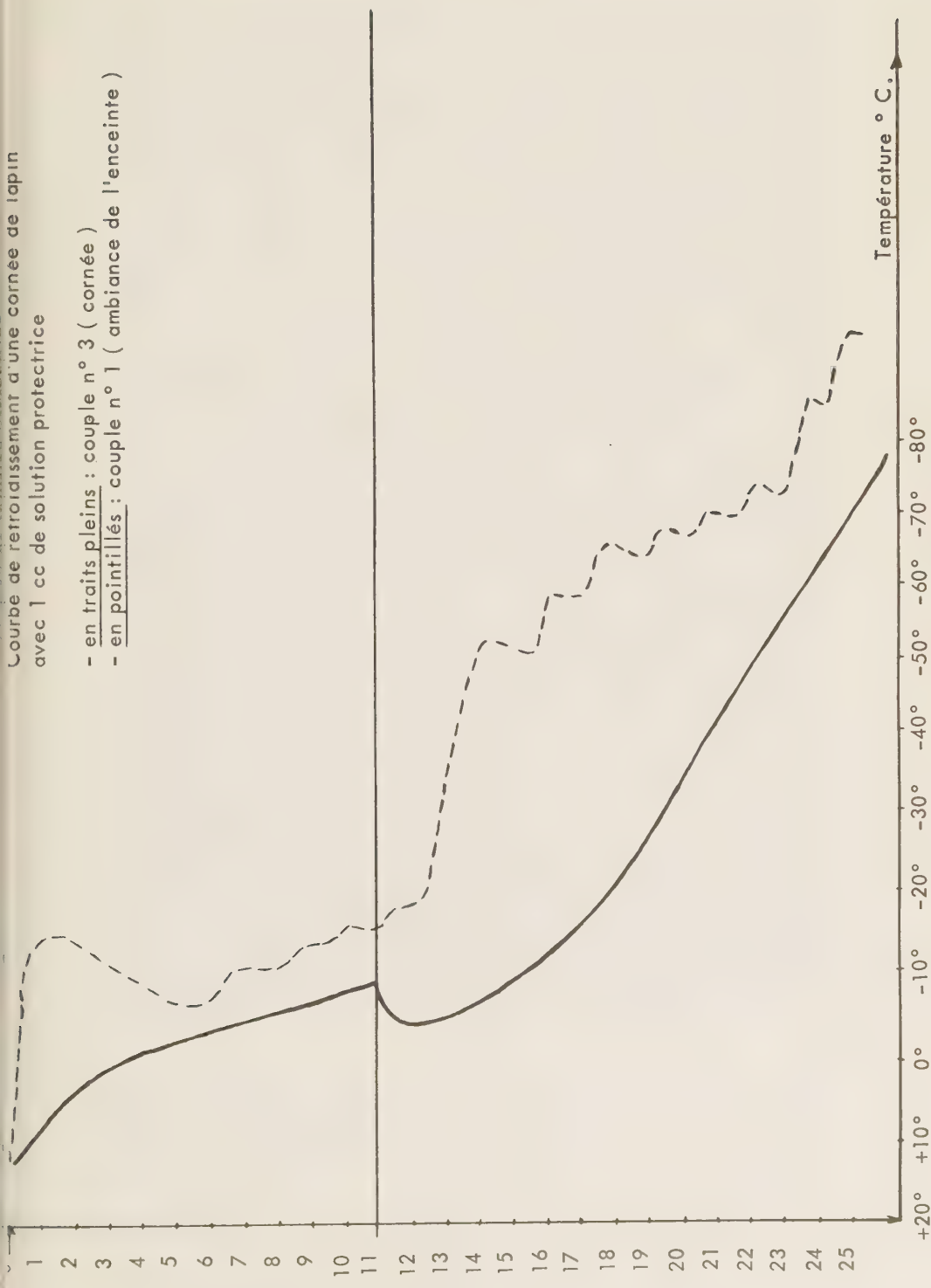
On a pu noter de temps en temps une disparition totale de l'endothélium d'une cornée. Cet accident nous a paru imputable à la 1ère manœuvre de l'expérience : le prélèvement des cornées entières avec leur collerette de sclère. En effet on enlève très facilement lors de cette manipulation, la Descemet dans son entier avec l'endothélium, qui restent accrochés au corps ciliaire. Ceci est probablement assez particulier aux globes de lapins.

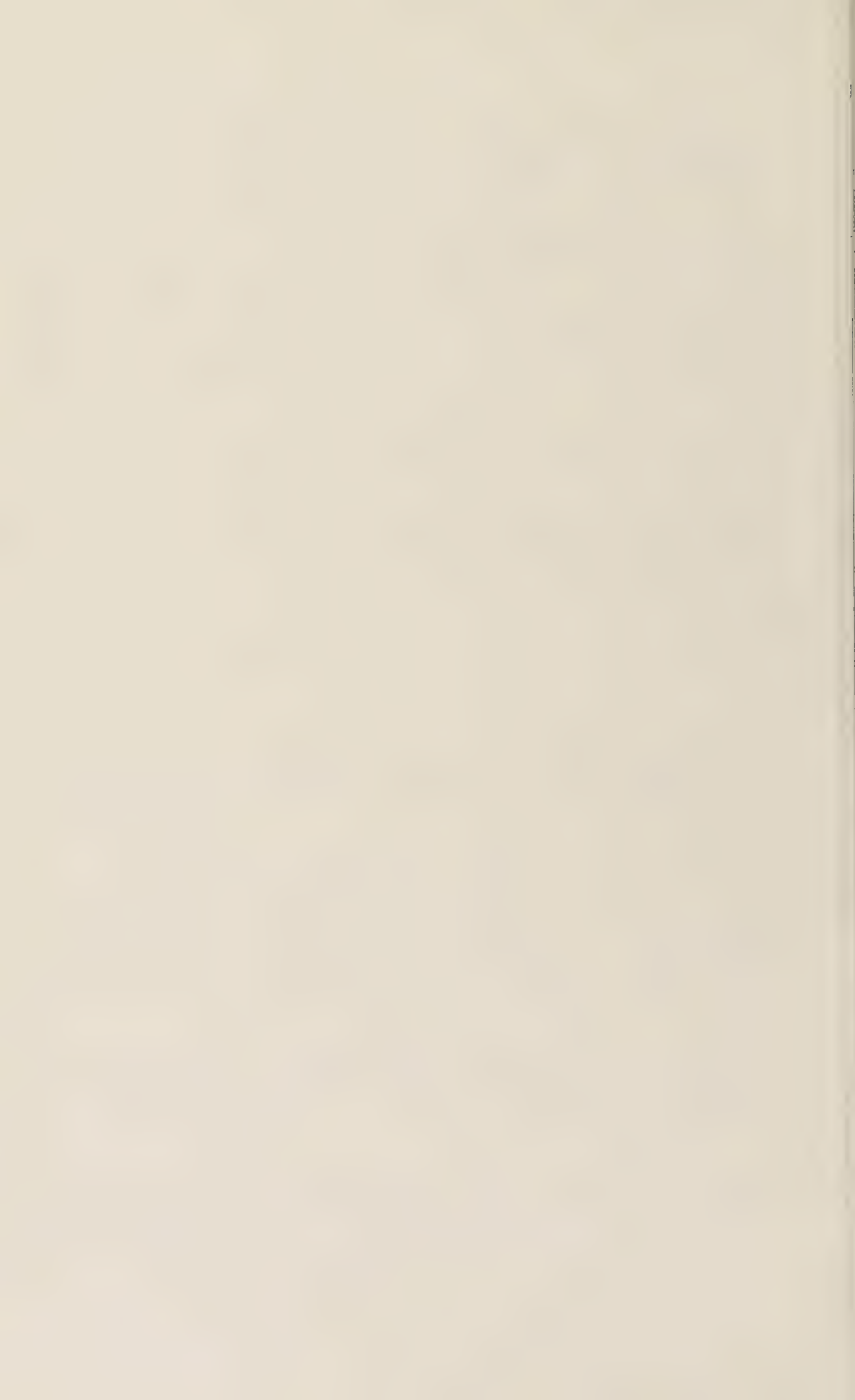
Nous n'avons pu définir de façon nette de différence dans les résultats obtenus en prolongeant ou en raccourcissant le plateau de la cristallisation. Il nous semble logique de préférer le raccourcir, mais nous espérons que la suite de l'expérimentation permettra de conclure.

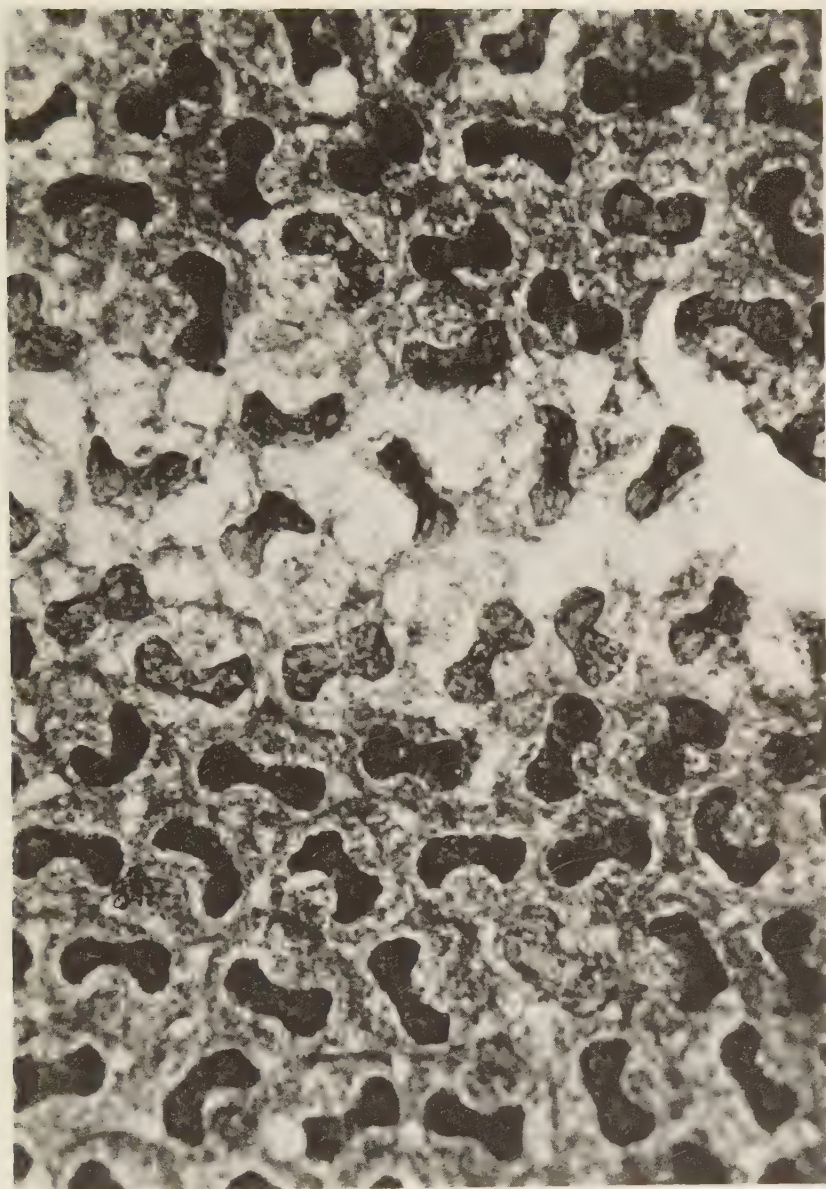
Les cornées les moins altérées étaient celles qui avaient été congelées sans liquide protecteur environnant. On avait alors un aspect histologique semblable à celui des cornées conservées 24 h à + 4°. Nous n'avons pas obtenu de cornées ayant après congélation l'aspect des cornées fraîches.

Courbe de refroidissement d'une cornée de lapin
avec 1 cc de solution protectrice

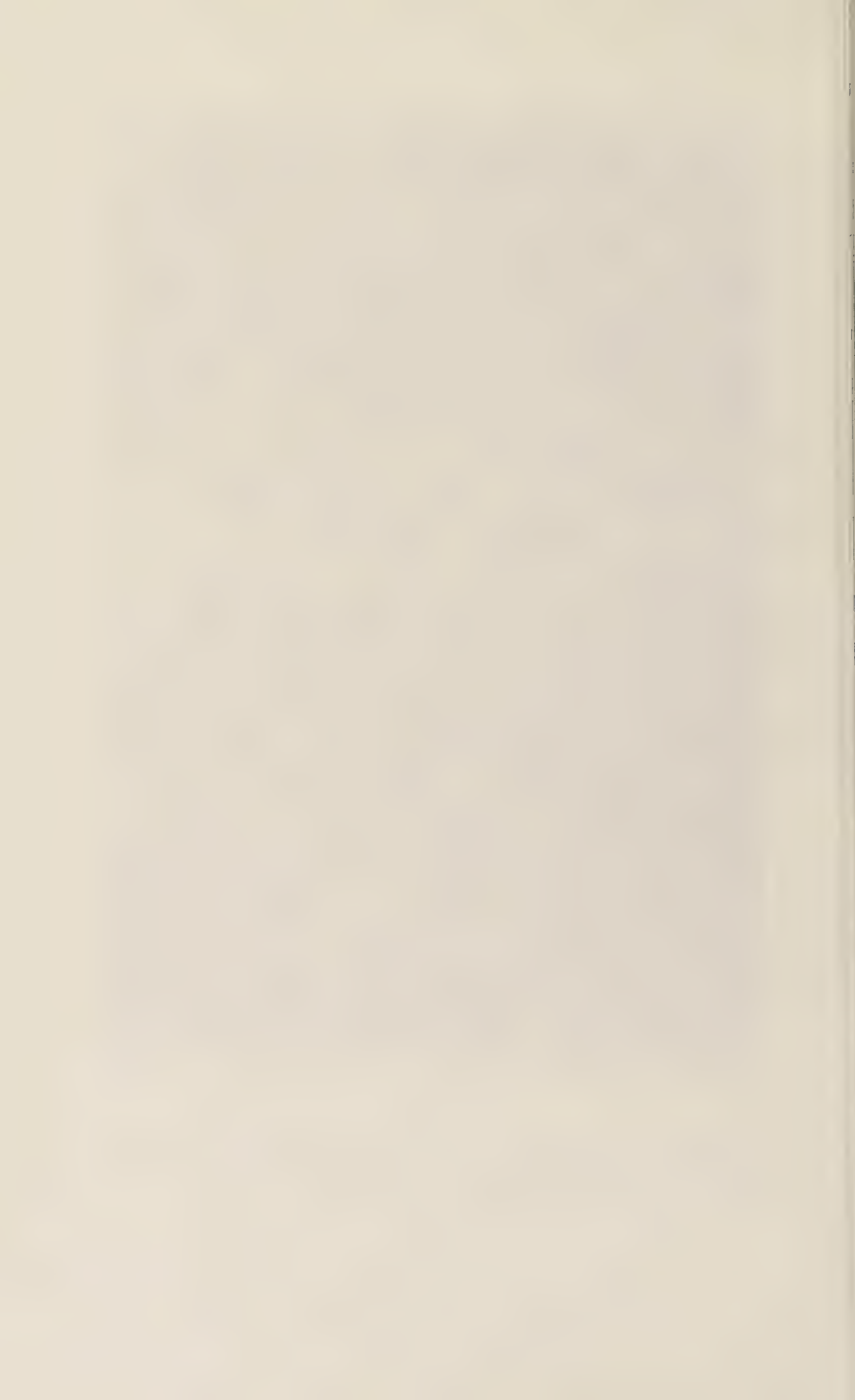
- en traits pleins : couple n° 3 (cornée)
- en pointillés : couple n° 1 (ambiance de l'enceinte)

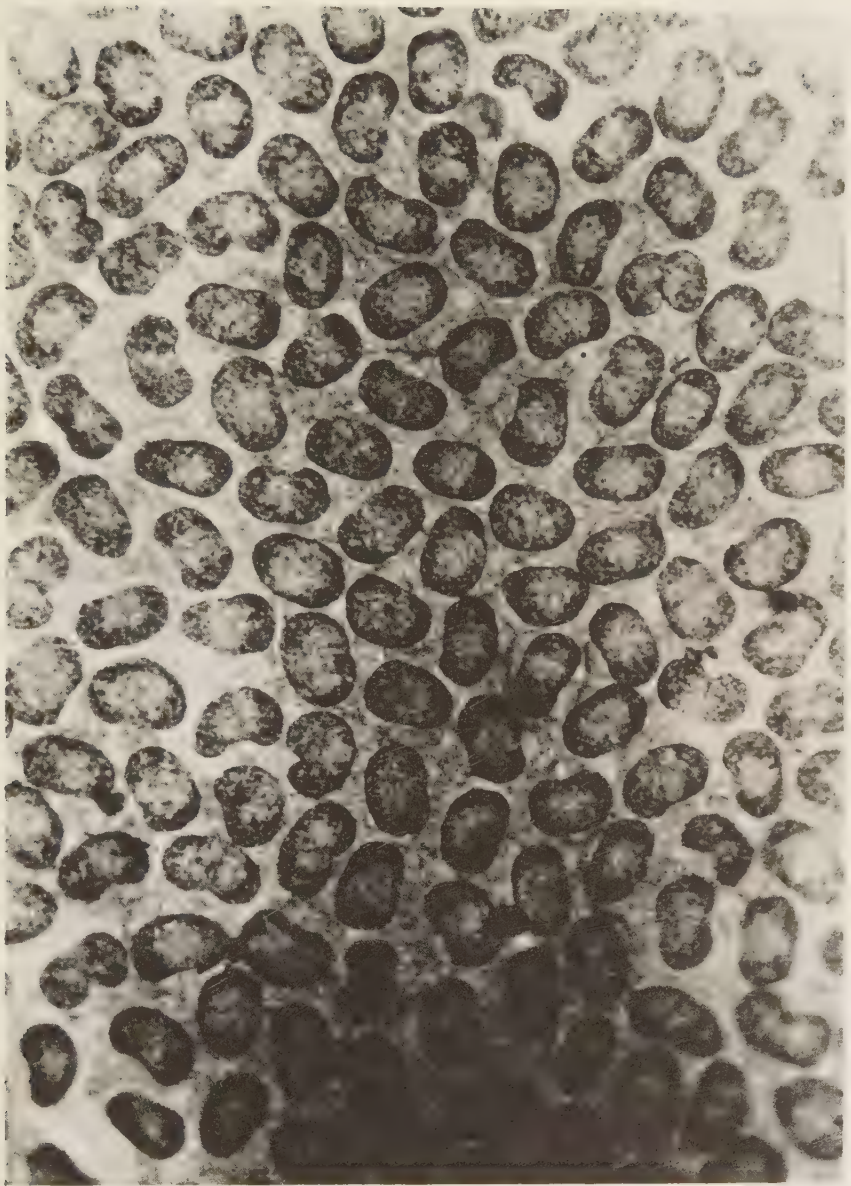




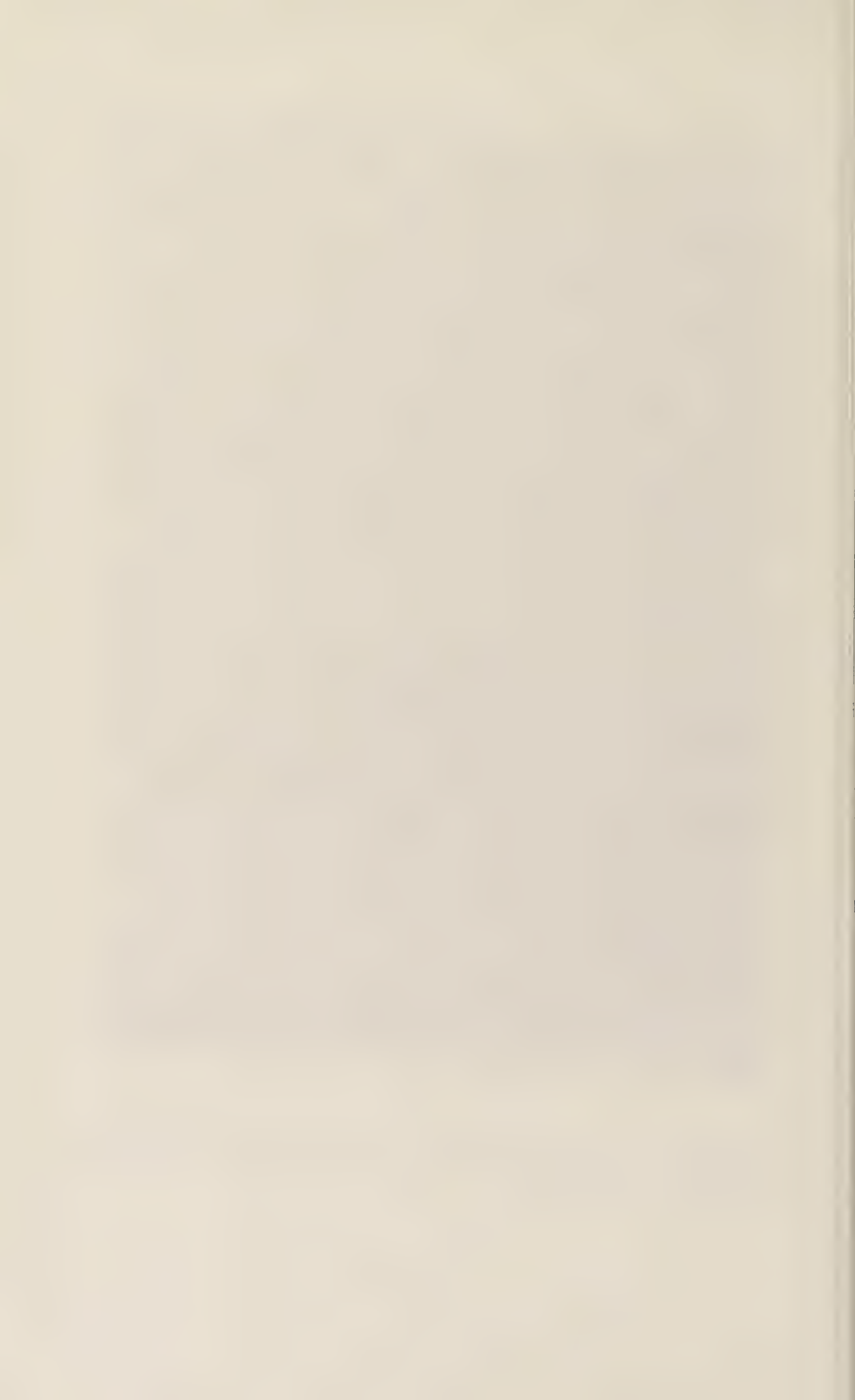


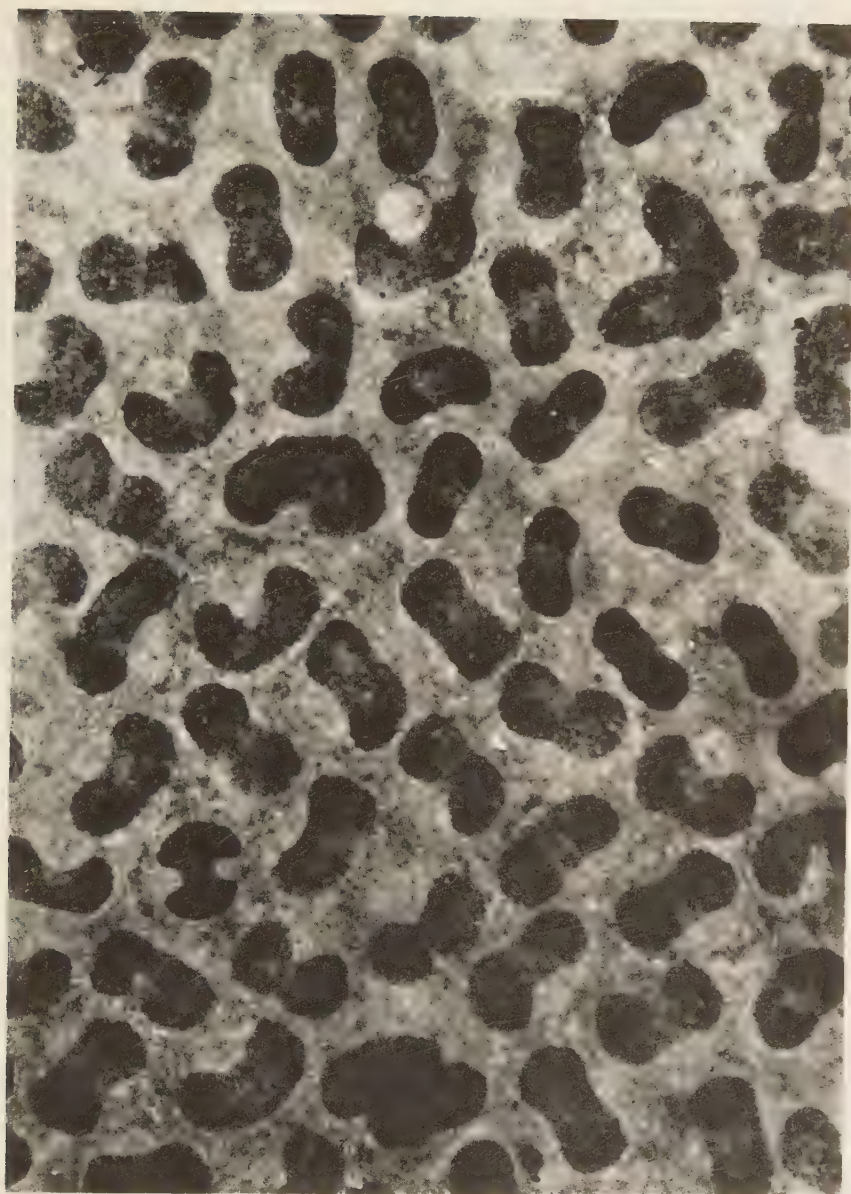
Endothélium d'un globe de Lapin conservé 4 jours à 4°:
Altérations très profondes : densification des noyaux, aspects en
haltère, vacuolisation extrême du cytoplasme.





Endothélium d'une cornée de Lapin conservée à -196° en sérum de Lapin : Gonflement des noyaux (forme ovoïde) , vacuolisation importante du cytoplasme.





Endothélium d'une cornée de Lapin conservée à -196° à sec''
Noyaux de forme normale, certains sont altérés (plus petits et plus denses). Cytoplasme très finement vacuolisé.



Enfin, il faut noter la grande quantité de bactéries retrouvées sur la majorité des préparations.

- Kératoplastie.

Nous n'avons pu faire que 12 kératoplasties avec un recul suffisant. Les résultats n'ont pas été satisfaisants.

Les accidents les plus fréquents ont été

- 1 - Déhiscence des sutures, imputables à une technique imparfaite de taille du greffon. Le meilleur moyen semble finalement de prélever sur la cornée posée endothélium vers le haut sur un plastique souple ou une plaque de paraffine. On obtient par simple pression d'un trépan bien ciguisé, et sans aucune rotation qui abîmerait les bords, un greffon parfaitement rond et à bords nets.
- 2 - Nécrose des plans antérieurs du greffon, apparaissant après 1 semaine, et que nous avons attribué à des phénomènes infectieux. En faveur de cette hypothèse plaident
 - l'absence de précautions d'asepsie lors de la préparation des solutions sérum - D.M.S.O.
 - la présence en quantité impressionnante de germes sur les cornées congelées.
- 3 - Hyphémas, que nous ne nous expliquons pas.
 - Enfin les deux derniers greffons semblent suivre une évolution plus normale, mais représentent un pourcentage beaucoup trop faible pour pouvoir conclure, d'autant plus qu'il semble bien que le pouvoir de régénération de l'endothélium cornéen du lapin est tel que le greffon peut être entièrement recouvert par l'endothélium du donneur en 2 mois (82).

c) En conclusion.

La discordance même entre les résultats des contrôles histologiques et des kératoplasties plaide en faveur de l'utilisation simultanée de ces deux méthodes au moins.

Certains faits semblent très probables :

- la mauvaise tolérance de l'endothélium aux solutions de D.M.S.O. à température ambiante,
- le caractère favorable de la congélation sans liquide environnant,

- la vitesse optima de refroidissement avant le point de cristallisation : entre 1,5 et 2,5°/minute,
- la nécessité d'une manipulation stérile,
- l'intérêt qu'il pourrait y avoir à faire des autogreffes avec greffons congelés.

D'autres sont plus problématiques :

- Faut-il ou non raccourcir le pallier dû au dégagement de chaleur de la cristallisation.
- La courbe de refroidissement, notamment au niveau de ce pallier, est-elle très différente suivant que l'enregistrement est fait dans le liquide protecteur seul, ou au niveau de la cornée.
- Peut-on appliquer à l'homme l'expérimentation faite sur le lapin.

Toutes ces questions ne sauraient trouver progressivement de réponse que dans la répétition systématique des expériences que nous nous proposons de faire.

CONCLUSION

La congélation aux très basses températures a soulevé l'espoir de conserver à long terme des cornées, munies d'un endothélium vivant et fonctionnel, pour kératoplasties transfixiantes.

Nous avons étudié les différentes méthodes actuellement utilisées, pour la congélation d'une part, le contrôle de la viabilité cellulaire d'autre part.

I - Concernant la technique de congélation :

1/ Il ressort des travaux faits jusqu'à maintenant que la vitesse de refroidissement doit être assez grande pour éviter une cristallisation trop importante et limiter la durée de contact des cellules avec un milieu hypertonique. Elle doit cependant rester dans les limites de la tolérance des cellules au choc thermique, tolérance très spécifique à chaque type de cellules. La définition exacte de la courbe de refroidissement optima ne pourra donc être obtenue, pour un tissu donné, que par tâtonnements progressifs.

Diverses équipes semblent avoir obtenu des résultats satisfaisants sur les cornées de lapin, de chien et d'homme.

2/ Dans notre première série d'expériences faites sur les cornées de lapins, nous avons utilisé un appareillage mis au point pour nous et permettant la programmation et l'enregistrement de la courbe de refroidissement. Il nous a semblé que le prolongement du plateau de congélation favorisé entre autres par la présence de liquide autour de la cornée traitée, était toxique pour l'endothélium.

En ce qui concerne les cryoprotecteurs, nous avons adopté la formule habituellement admise : D.M.S.O. à 7,5 %. Mais il nous a semblé qu'il fallait éviter autant que possible le contact de la cornée avec le D.M.S.O. à température supérieure à + 4°.

Cependant notre série est encore trop restreinte, et les résultats trop incomplets, pour permettre une conclusion définitive.

II - Nous nous sommes attachés surtout aux méthodes de contrôle de la validité cellulaire.

1/ L'examen morphologique : en histologie classique nous semble un moyen simple, fidèle, et relativement facile à standardiser, adapté aux besoins d'un premier tri, même s'il ne prétend pas donner de renseignements d'ordre métabolique. L'examen en ultra-structure que nous n'avons encore pu utiliser sera certainement d'un apport extrêmement intéressant.

2/ Parmi les tests simples de vitalité cellulaire

- les colorations vitales classiques aux colorants anioniques nous semblent également utilisables, malgré la marge assez grande laissée à l'interprétation.

- par contre, les méthodes histo-enzymatiques, telles qu'on peut les pratiquer actuellement de façon courante, nous paraissent très insuffisamment précises et reproductibles pour permettre une interprétation fiable dans la recherche de la validité cellulaire.

3/ Parmi les tests de multiplication cellulaire la culture de tissus mériterait une mise au point adaptée aux besoins précis de cette expérimentation, sans oublier cependant que reproduction et fonctionnement ne sont pas nécessairement liés. Dans l'état actuel de notre expérimentation, elle donne des résultats trop optimistes.

4/ Enfin nous n'avons pu expérimenter ici, ni les dosages de produits du métabolisme cellulaire, ni surtout les tests physiques des propriétés des membranes cellulaires, qui ne sont malheureusement pas encore techniquement au point pour le sujet qui nous intéresse.

5/ La kératoplastie expérimentale est évidemment indispensable en tenant compte de la marge d'inconnue qu'il y a entre l'animal utilisé et l'homme et du facteur d'incertitude que représente la réaction immunologique liée à l'homogreffe. La plus souhaitable est le repérage des cellules endothéliales du donneur ou du receveur aux produits radio-actifs (mais il implique un traumatisme préalable de l'endothélium), ou par repérage des chromatines sexuelles.

Finalement, aucun de ces modes de contrôle ne nous a paru assez spécifique et précis pour suffire à lui seul à affirmer la valeur d'un endothélium conservé pour une kératoplastie transfixiante.

Il faudrait grouper au moins : l'examen morphologique et la kératoplastie expérimentale avec contrôle histologique, et ce sur d'assez grandes séries, observées pendant un temps prolongé, ce que nous nous proposons de faire dans la suite de cette expérimentation.

Vu, le président de thèse

Guy OFFRET

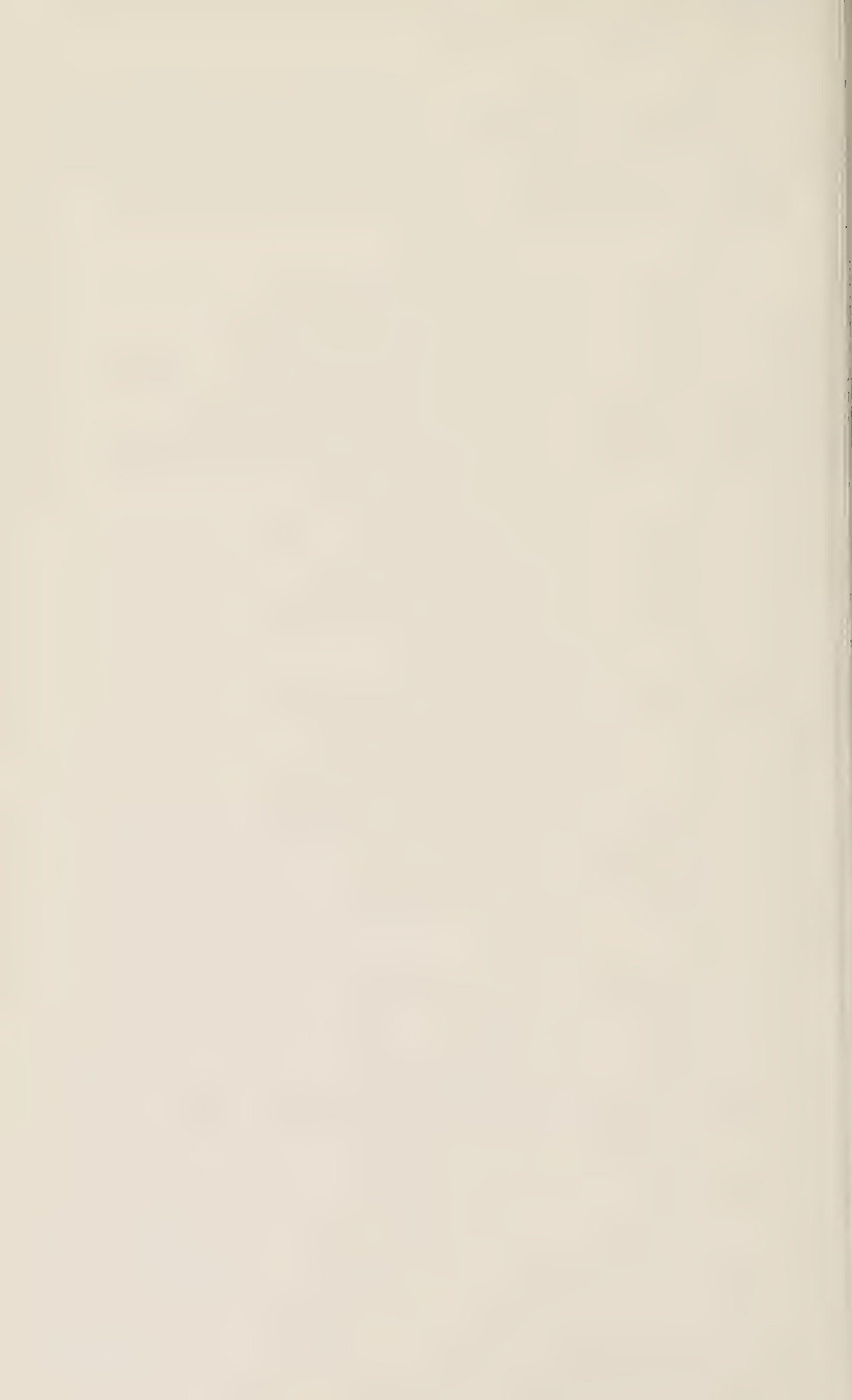
Vu, le doyen de la Faculté

G. BROUET

Vu et permis d'imprimer

le recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET



BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AGARWAL (L.P.), BHUYAN (K.C.), MISHRA (R.K.)
GHANSKAR (M.)

Respiratory metabolism of corneal layers of rabbit and its alteration by storage.

Orient. Arch. ophthalm., 1968, 6, 257-270.

- 2 - ANDREW (S.S.) et coll.

The effect of cryoprotective agents on intermolecular SS formation during freezing of thiogel.

Cryobiology, 1967, 4, 85-89.

- 3 - AONO (H.)

Studies on the frozen stored cornea. I- On the viability of the frozen stored corneas.

J. Rev. Clin. Ophthalm., 1960, 15, 465-472

- 4 - AONO (H.)

Studies on the frozen stored cornea. IV- Experimental keratoplasty of the preserved cornea.

Folia Ophthalm., Jap., 1962, 13, 38-43.

- 5 - AONO (H.)

Studies on the frozen stored cornea. III- Electron microscopic observation on the cornea. Pt 2. On the changes of the Descemet's membrane and endothelial cell layer.

Folia ophthalm. Jap., 1962, 13, 109-117.

- 6 - ASHWOOD-SMITH (M.J.)

Radioprotective and cryoprotective properties of D.M.S.O. in cellular systems.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1967, 141, 45-62.

- 7 - AURELL (G.), DOHLMAN (C.H.), RODIN (L.)

The viability of the stored cornea

Acta Ophthalm. (Kobenhavn), 1956, 34, 281-292.

8 - BAJENOVA (M.A.)

Culture des tissus de la cornée conservée.

Arch. Ophtal. (Paris), 1936, 53, 300-307

8 bis - BASU (P.K.), MILLER (I.), ORMSBY (H.L.)

Viability of stored cornea of the rabbit. On the chorio allantoic membrane of the chick.

Amer. J. Ophthal. 1957, 44, 209-212.

9 - BASU (P.K.), MILLER (I.), ORMSBY (H.L.)

Sex chromatin as a biologic cell-marker in the study of the fate of the corneal transplant.

Am. J. Ophthal., 1960, 49, 513-515.

10 - BAUM (J.L.)

Histochemical study of corneal, Respiratory enzymes.

Arch. Ophtal. (Chicago), 1963, 70, 59-67.

11 - BICKIS (I.J.), KAZAKS (K.), FINN (J.J.), HENDERSON (I.W.D.)

Permeation kinetics of glycerol and DMSO in Novikof hepatoma ascitis cells.

Cryobiology, 1967, 4, 1-10.

11 bis - BERNARD (J.A.)

Etude expérimentale de l'homogreffe transfixiante de cornée chez le lapin. Conséquences cliniques et anatomopathologiques.
Thèse 1969, Paris.

12 - BINDER (R.F.) et BINDER (H.F.)

Regenerative processes in the endothelium of the cornea.

Arch. Ophtal. (Chicago), 1957, 57, 11-13.

13 - BLODI (F.C.), SULLIVAN (T.)

Changes of respiratory enzymes in stored corneas.

Acta Ophtal. (Kobenhavn)., 1968, 46, 721-724.

14 - BROWN (R.M.), TREVOR-ROPER (P.D.)

A clinical method for assessment of endothelial viability in donor cornea.

Brit. J. Ophthal., 1968, 52, 882-886.

15 - BUSCHKE (W.), HOWARD (A.), SIEGEL (L.)

Nitrogen fractions as criterion of preservation of corneal tissue.

Arch. Ophtal. (Chicago)., 1965, 74, 669-673.

- 16 - CAPELLE (J.A.), KAUFMAN (H.E.), ROBBINS (J.E.)
 Preservation of viable corneal tissue.
 Arch. Ophthal. (Chicago). 1965, 74, 669-673.
- 17 - CAPELLA (J.A.), KAUFMAN (H.E.), ROBBINS (J.E.)
 Preservation of viable corneal tissue.
 Cryobiology, 1965, 2, 116-121.
- 17 bis - CARDIA (L.) et Coll.
 Ultra structural characteristics of the corneal endothelium Preliminary note.
 Bull. Oculist., 1967, 46, p. 891-901.
- 18 - CHI (H.H.), KELMAN (C.D.)
 Effects of freezing on ocular tissues. I- Clinical and histologic study of corneal endothelium.
 Amer. J. Ophthal. 1966, 61, 4, 630-641.
- 19 - CHI (H.H.), TENG (C.C.), KATZIN (H.M.)
 Histopathology of corneal endothelium after freezing.
 Int. ophthal. Clin., 1967, 7, 369-380.
- 20 - CHI (H.H.), TENG (C.C.), KATZIN (H.M.)
 Healing process in the mechanical denudation of the corneal endothelium.
 Amer. J. Ophthal., 1960, 49, 693-703.
- 21 - CHI (H.M.), TENG (C.C.), KATZIN (H.M.)
 The fate of endothelial cells in corneal homografts.
 Amer. J. Ophthal., 1965, 59, 186.
- 22 - CLEASBY (G.W.), BYLAND (S.S.), WEBSTER (G.)
 A simplified technique for experimental keratoplasty.
 Amer. J. Ophthal., 1965, 60, 894-899
- 23 - COCHRANE (T.)
 The low temperature storage of skin : a preliminary report.
 Brit. J. Plastic surgery, 1968, 21, 118-125.
- 23 bis - COCKERAM (A.M.), BASU (P.K.), ORMSBY (H.L.)
 Viability of corneal epithelium and fibroblasts after long-term storage.
 Amer. J. Ophthal., 1957, 43, 380-384.

- 24 - COMBRISSE (A.), CALOREST (J.), CHAMPCOMMONAL (A.),
PANNETIER (C.H.).

Conservation de Globules Rouges par congélation en présence
de glycérol.

I. Procédés de conservation et premiers résultats.

Rev. Franç. Transf., 1968, 11, 7-22.

- 25 - DICKENS (J.A.).

The frozen limits.

Roy. Soc. Health J., 1967, 87, 164-167.

- 26 - DOEBBLER (G.F.).

Cryoprotective compounds - Review and discussion of structure
and function.

Cryobiology, 1966, 3, 2-11.

- 27 - DOHLMAN (C.H.).

On the metabolism of the corneal graft.

Acta Ophthal. (Kobenhavn).

- 28 - DOHLMAN (C.H.) et coll.

The artificial corneal endothelium - Surgical techniques and
management.

Arch. Ophthal. (Chicago)., 1968, 79, 150-158.

- 29 - DOHLMAN (C.H.), AHMAD (B.).

Use of preserved non viable cornea in penetrating keratoplasty,
with an artificial endothelium.

Arch. ophthal. (Paris)., 1967, 27, 747-754.

- 30 - DRAHEIM (J.W.), Mc PHERSON (S.D.) Jr, EVANS (V.J.),
EARLS (W.R.).

Further studies on the viability of frozen cornea : As determi-
ned in tissue culture.

Amer. J. Ophthal., 1957, 44, pt II, 182-189

- 31 - DRAHEIM (J.W.), Mc PHERSON (S.D.) Jr., EVANS (V.J.),
PERRY (V.P.), EARLS (W.R.).

Tissue culture viability of preserved cornea.

Transplant. Bull., 1955, 2, 145.

- 32 - DUANE (T.B.).

The respiration of the stored cornea.

Amer. J. Ophthal., 1948, 31, 1400-1404.

- 33 - EASTCOTT (H.H.G.), CROSS (A.G.), LEIGH (A.G.) NORTH (D.P.)
 Preservation of corneal grafts by freezing.
Lancet I, 1954, 237-239.
- 34 - EPSTEIN (M.H.), O'CONNOR (J.S.)
 Comparaison of liquid propane and liquide nitrogen in tissue preservation.
Cryobiology, 1966, 2, 342-344.
- 35 - ESILA (R.), TENHUNEN (T.).
 DMSO. Lens changes, composition of the anterior aqueous humour and intra-ocular pressure in rabbits during oral administration.
Acta. Ophthal. (Kobenhavn)., 1961, 45, 530-535.
- 36 - ESPIRITU (R.B.), KARA (G.B.), TOBOWITZ (D.).
 Studies on the healing of corneal grafts : II - The fate of endothelium of the grafts as determinated by sex chromatin studies.
Amer. J. Ophthal., 1961, 52, 91-95.
- 37 - EVANS (H.M.), SCHULEMANN (W.).
 The action of vital stains belonging to the benzidine group.
Science, 1914, 39, 443.
- 38 - EYGONNET (J.P.).
 Freezing and long term preservation of the rat intestine at the temperature of liquid nitrogen.
Agressologie, 1967, VIII, 1, 83-87.
- 39 - FARRANT (J.), WALTER (C.A.), ARMSTRONG (J.A.)
 Preservation of structure and function of an organized tissue, after freezing and thawing.
Proc. Roy. Soc. (Biol.), 1967, 168, 293-310.
- 40 - FAURE (J.P.), KIM (Y.Z.), PAYRAU (P.).
 Une méthode de conservation des cornées à basse température.
Arch. ophtal. (Paris), 1967, 27, 781-788.
- 41 - FRASER (J.), GILL (W.).
 Observation on ultra-frozen tissue.
Brit. J. Surg., 1967, 54, 770-776.
- 42 - GRANT (N.H.), ALBORN (H.E.).
 Acceleration of enzyme reactions in ice.
Nature (London), 1966, 212, 194-

- 42 bis - GRAY (P.), PICKLE (F.M.), MASER (M.D.), MAYWEISER (L.J.)
 Oxazine dyes - I Celestine Blue B - with iron as a nuclear stain.
 Stain. Tech., 1956, 31, p. 141.
- 43 - GREENE (A.E.), ATHROYA (B.), LEHR (H.B.), CORELL (L.L.)
 Viability of cell culture after long time conservation in liquid nitrogen.
 Proc. Of the Society for Exp. Biology and Medicine,
 1967, 124, 1302-1307.
- 44 - GREIFF (D.) et coll.
 Cryotolerance of enzymes. I - Freezing of lactic deshydrogenase.
 Cryobiology, 1966, 2, 335-341.
- 45 - GROSS (W.D.)
 Optimal conditions for freeze preservation with DMSO.
 Z. Naturforsch. (B.), 1968, 23, 512-519.
- 46 - GUBIACH (W.)
 Gefrier Hautchenpräparate orderer Augengewabe
 Greefs. Arch. Klin. Exp. ophthal. (Germany, 1967, 172,
 346-354.)
- 47 - HANNA (C.)
 The fate of cells in the transplant.
 Survey ophthal. 1966, 11, 405-414.
- 48 - HANNA (C.), IRWIN (E.S.)
 The fate of cells in the corneal grafts.
 Arch. Ophthal. (Chicago), 1962, 68, 810-817.
- 49 - HARRIS (J.E.)
 Symposium on the cornea : Introduction : Factors influencing
 corneal hydratation.
 Invest Ophthal., 1962, 1, 151-157.
- 50 - HARRIS (J.E.)
 Current thoughts on the maintenance of corneal hydratation in
 vivo.
 Arch. Ophthal. (Chicago), 1967, 78, 126-132.
- 51 - HEDBYS (B.Ö.)
 Studies on the hydratation of the corneal stroma.
 M.D. Thesis Lund. 1969

52 - HAVEMEYES (R.N.).

Freezing-point curve of DMSO-water solutions.
J. Pharm. Sci. 1966, 55, 851-853.

53 - HEBER (U.).

Freezing injury in relation to loss of enzymes activities and protection against freezing.

Cryobiology, 1968, 5, n° 3, 188-201.

54 - HOKI (A.), KOBE (J.).

Types of freezing and the post thawing survival of mammalian tissue.

Med. Sci., 1967, 13, 67-79.

55 - HOLMBERG (B.).

On the permeability to Lissamine green and other dye in the course of cell injury and cell death.

Exp. Cell. Research., 1961, 22, 406-414.

56 - HOLMBERG (A.), AHMAD (B.), DOHLMAN (C.H.).

Machining donor material for keratoplasty.

Amer. J. Ophthal., 1968, 66, 341-343.

57 - HONNEGER (H.), SCHIERHOLTER (R.).

Das Histologische Bild des Hornhaut-endothels im Häutchen präparat.

Graefes arch. Ophthal. 1963, 166, 359-377.

58 - HUNZINGER (R.), LE GAL (Y.).

Congélation de pièces de grande taille.

Ann. Anat. Path. (Paris), 1968, 13, n° 2, 268-272.

59 - ILIFF (Ch.E.), WOOD (R.M.), HOLLANDER (D.M.).

Successful transplantation of a frozen human cornea.

Amer. J. Ophthal. 1956, 41, 505-506.

60 - IRWIN (A.R.), IRWIN (A.R.) Jr.

Variation in normal human corneal endothelium. A preliminary report of pathologic human corneal endothelium.

Am. J. Ophthal., 1953, 36, 1279.

61 - ITO (Y.).

Histochemical studies of the polygonal cells of the rabbit cornea in tissue culture. 1- PAS positive substance of the polygonal cells.

Acta Soc. Ophthal. Jap. (Jap.), 1966, 70, 769-786.

62 - ITO (Y.).

Histochemical studies on the polygonal cells of the rabbit cornea in tissue culture. 2- Lipids of the polygonal cells.

Acta. Soc. Ophthal. Jap. (Jap.), 1966, 70, 2159-2170.

63 - JAGODZINSKI (R.V.).

Obtaining Time-Temperature profiles.

Cryobiology, 1966, 2, 193-197.

64 - JANS (R.G.), HASSARD (D.T.R.).

Lissamine green. A supra-vital stain for determination of corneal endothelial viability.

Canad. J. Ophthal., 1967, 2, 297-302.

65 - JOYCE (P.D.).

Corneal vital staining.

Irish J. Med. Sci., 1967, 500, 359-367.

66 - KAROW (A.M.) Jr.

Toxicity of high DMSO concentration in rat heart freezing.

Cryobiology, 1967, 3, 464-468.

67 - KAROW (A.M.) Jr. , WEBB (W.R.).

The toxicities of various solute moderators used in hypothermie.

Cryobiology, 1965, 1, 270-274.

68 - KATZIN (M.), MARTINEZ (M.).

Endothelial studies of corneae preserved in various media.

Arch. Soc. Amer. Ophthal. Optom., 1959, 2, 173-180.

69 - KAUFMAN (H.E.).

Preserving corneas by freezing.

Arch. Ophthal. (Chicago). 1965, 73, 907-908.

70 - KAUFMAN (H.E.), CAPELLA (J.A.).

Living preserved corneal tissue for regular penetrating keratoplasty and bullous keratopathy.

Corneoplastic surgery Proc. 2nd int. corneoplastic Conference 1967, 483-493, London. Ed. by P.V. Rycroft Pergamon Press Oxford 1969.

71 - KAUFMAN (H.E.), CAPELLA (J.A.), ROBBINS (J.E.).

A study of enzyme activity in corneal repair.

Invest. Ophthal., 1964, 3, 34-46.

72 - KAUFMAN (H.E.), CAPELLA (J.A.), ROBBIN (J.E.).

The human corneal endothelium.

Amer. J. Ophthal., 1966, 61, 835-841.

73 - KAUFMAN (H.E.), CAPELLA (J.A.), ESCAPINI (H.), KAPLAN (M.)
ROBBINS (J.E.).

Corneal endothelium and preservation of living corneal tissue.

pp. 869-878, in Ophthalmology Proc. XX Int. Cong. Munich,
14-19 august 1966. Pt II Excerpta Med. Found Amsterdam,
1967, Int. Cong. Ser. n° 146.

74 - KAUFMAN (H.E.), ESCAPINI (H.), CAPELLA (J.A.), ROBBINS (J.E.),
KAPLAN (M.).

Living preserved corneal tissue for penetrating keratoplasty.

Arch. Ophthal. (Chicago)., 1966, 76, 471-476.

75 - KAUFMAN (H.E.), ROBBINS (J.E.), CAPELLA (J.A.).

Endothelium normal and abnormal cornea.

Tr. Am. Acad. Ophthal. and Otolaryng., 1965, 69,
931-942.

76 - KEATING (W.R.), PRESTON (C.), STONE (B.A.).

Use of freezing to prepare thin strips of fonctionning arterial
smooth muscle (Proceeding of the Physiol. Soc. June 68).

J. Physico. (London)., 1968, 198, 1 P.- 2 P.

77 - KING (J.H.) Jr.

Different types of preserved grafts.

Trans. Amer. Acad. Ophthal. Otolaryng., 1963, 67,
300-301

78 - KLEIN (E.) et coll.

Effects of DMSO on lipoproteins stored at low temperatures.

Cryobiology, 1967, 3, 407-413.

79 - KUMING (B.S.), RYCROFT (P.V.).

A study of post-mortem viability of corneal endothelial cells.

p. 507-510, in cornea-plastic surgery Proc. 2nd int. corneo-
plastic conference, London 1967, Ed. by P.V. Rycroft
Pergamon Press, Oxford, 1969.

80 - LANGHAM (M.E.).

The interrelationship of metabolism and deturgescence of the
living cornea.

Invest. Ophthal, 1962, 1, 187-194.

81 - LARSEN (S.S.).

Chemical reactions in frozen solutions : A review.
Dansk T. Farm., 1967, 41, 177-190.

82 - LEE (W.R.), MUELLER (F.O.), TREVOR-ROPER (P.D.).

In vivo survival of the endothelium of freeze stored corneal
homografts in the rabbit.
Brit. J. Ophthal., 1967, 51, 321-330.

83 - LEIGH (A.G.), RIDGE (J.W.).

Some problems of the preservation of corneal tissue by freezing.
Trans. Ophthal. Soc. U.K., 1957, 77, 367-377.

84 - LOVELOCK (J.E.), BISHOP (M.W.H.).

Prevention of freezing damage to living cells by DMSO.
Nature (London), 1959, 183, 1394-1395.

85 - LOWRY (G.M.).

Corneal endothelium in vitro : Characterisation by ultra-structure
and Histochemistry.
Invest. Ophthal., 1966, 5, 355-366.

86 - LUYET (B.J.).

Tentative d'analyse systématique de la notion de vitesse de
congélation et d'appréciation des éléments essentiels de variation.
Cryobiology, 1966, 11, n° 4, 198-205.

87 - LUYET (B.J.), RASMUSSEN (D.).

Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability
of rapidly cooled solutions of glycerol, ethylene-glycol,
sucrose and glucose.
Biodynamica, 1968, 10, 167-191.

88 - Mc ENTYRE (J.M.).

Experimental penetrating keratoplasty in the dog.
Arch. Ophthal. (Chicago)., 1968, 80, 372-376.

90 - Mc PHERSON (S.D.) Jr., DRAHEIM (J.W.), EVANS (V.J.),
EARLE (W.R.).

The viability of fresh and frozen corneas as determined in tissue
culture.
Amer. J. Ophthal., 1956, 41, 513-519.

91 - Mc PHERSON (S.D.) Jr., MORRISON (H.M.) Jr.

The use of corneas from frozen whole eyes. For emergency keratoplasty.

Amer. J; Ophthalm., 1962, 53, 917-922.

92 - MAGITOT (A.).

Recherches expérimentales sur la survivance possible de la cornée conservée en dehors de l'organisme et sur la kératoplastie différée.

Ann. Ocul. (Paris), 1911, 146, 1-34.

93 - MAGITOT (A.).

Possibilité de conserver à l'état de vie ralentie pendant un temps indéterminé la cornée transparente de l'oeil humain.

Arch. Ophthalm. (Paris), 1912, 32-68.

94 - MALIK (S.R.), GUPTA (A.K.), SOTA (L.D.).

Fate of endothelium in corneal homografts. An experimental study.

Brit. J. Ophthalm., 1968, 52, 893-897.

95 - MALININ (Th. I.), PERRY (V.P.).

A review of tissue and organ viability assay.

Cryobiology, 1967, 4, 104-115.

96 - MAZUR (P.).

Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells.

Cryobiology 1965, 2, 180-192.

97 - MAZUR (P.).

Physical and chemical changes during freezing and thawing of cells with special reference to blood cells.

Bibl. Haemat., 1968, 29, 764-777.

98 - MAZUR (P.), SMITH (J.J.).

Interactions of cooling velocity, temperature and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast.

Cryobiology., 1968, 5, n° 1, 1-17.

99 - MELNICK (P.J.).

Histochemical identification of enzyme activity in frozen tissues and tumors.

Cryobiology, 1964, 1, 140-149.

100 - MERYMAN (H.T.).

Mechanics of freezing in living cells and tissues.
Science, 1956, 124, 515-526.

101 - MERYMAN (H.T.).

The interpretation of freezing rates in biological materials.
Cryobiology, 1966, 2, 165-170.

102 - MILLS (N.L.), DONN (A.).

Incorporation of tritium-labelled thymidine by rabbit corneal endothelium.

Arch. Ophthal. (Chicago), 1960, 64, 443-446

103 - MISHIMA (S.), HEDBYS (B.O.).

The permeability of the corneal epithelium and endothelium to water.

Exp. Eye. Res. 1967, 6, p.10-32.

104 - MIZUKAWA (T.), KIKKAWA (Y.), HARA (J.).

A study on the function of stored cornea : an evaluation of some new methods.

Acta Soc. Ophthal. Jap., 1965, 69, 757-763.

105 - MUELLER (F.O.).

Techniques for full thickness keratoplasty in rabbits, using fresh and frozen corneal tissue.

Brit. J. Ophthal., 1964, 48, 377-393.

106 - MUELLER (F.O.).

Experiments on canine corneal donor material, stored in liquid Nitrogen.

Brit. J. Ophthal., 1968, 52, 649-658.

107 - MUELLER (F.O.).

Short time experiments on grafting fresh and frozen corneal tissues in dogs.

Brit. J. Ophthal., 1968, 52, 752-762.

108 - MUELLER (F.O.).

Storage of corneal donor material

Brit. J. Ophthal., 1969, 53, 360-

109 - MUELLER (F.O.), CASEY (T.A.), TREVOR-ROPER (P.D.).

Use of deep-frozen human cornea in full-thickness grafts.

Brit. Med. J. II, 1964, 473-475.

110 - MUELLER (F.O.), O'NEILL (P.), TREVOR-ROPER (P.D.).

Full-thickness corneal grafts in Addis-Abeba, Ethiopia.
 Brit. J. Ophthal. 1967, 51, 227-245.

111 - MUELLER (F.O.), SMITH (A.U.).

Some experiments on grafting frozen corneal tissue in rabbits.
 Exp. Eye Res., 1963, 2, 237-246.

112 - NASH (T.).

Prevention of freezing damage to living cells by pyridine
 N. Oxide.
 Nature (London), 1961, 192, 360-361.

113 - NASH (T.).

The chemical constitution of compounds which protect erythro-
 cytes against freezing damage.
 J. gen. Physiol. 1962, 46, 167-175.

114 - NEMETZ (U.R.).

Biologische Untersuchungen an überlebendem Hornhautgewebe
 und ihre Beziehungen zur Keratoplastik.
 Graefe Arch. Ophthal., 1958, 159, 609-635.

115 - NICHOLAS (J.P.).

Whole mounts of the corneal endothelium.
 Arch. Ophthal., 1965, 73, 555-558.

116 - NOVIKOFF (A.B.), SHIN (W.Y.), DRUCKER (J.).

Mitochondrial localisation of oxydative enzymes : staining re-
 sults with two tetrazolium salts.
 J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 47-61.

117 - DE OCAMPO (G.).

A new concept of corneal viability.
 Ophthalmology Proc. XX Int. Cong. Munich, 14-19 août
 1966, pt. II, 1057-1061.
 (Excerpta Med. Found Amsterdam, 1967, Inter. Congr.
 Ser. n° 146).

118 - DE OCAMPO (G.), ESPIRITO (R.), SUNGA (R.).

Human, animal and in vitro experimental studies in corneal
 viability.
 J. Philipp. Med. Ass., 1961, 37, 1067-1082.

119 - DE OCAMPO (G.), FOJAS (M.R.).

A new test for the viability of conjunctival and corneal endothelial cells.

Amer. J. Ophthal., 1961, 52, 923-927.

120 - DE OCAMPO (G.), SALCEDA (S.).

A biological viability test for corneal endothelium.

Amer. J. Ophthal., 1966, 61, 1514-1521.

121 - OCHI (M.), TAKEUCHI (M.), KOYAMA (T.).

Viability of rabbit cornea stored at low temperature.

Acta.Soc. Ophthal. Jap., 1960, 64, 1401-1410.

122 - OCHI (M.), TAKEUCHI (M.), KOYAMA (T.).

Studies on the viability of rabbit cornea stored at low temperature.

Jap. J. Ophthal., 1961, 5, 10-19.

123 - O'NEILL (P.), MUELLER (F.O.), TREVOR-ROPER (P.D.).

On the preservation of cornea at -196 degrees C for full thickness homografts in man and dog.

Brit. J. Ophthal., 1967, 51, 13-30.

124 - OFFRET (G.), PAYRAU (P.).

Résultat de 85 examens anatomopathologiques de kéroplasties expérimentales.

Symposium Européen des kéroplasties., Prague,
19-21 octobre 1960.

125 - PAKARINEN (P.).

The activity of some enzymes of preserved corneal grafts (Congres. XVIII ophthal. Septentrionalium - Copenhagen, 1967).

Acta Ophthal. (Kobenhavn), 1968, 46, 574-

126 - PAKARINEN (P.).

Preservation of the donor corneal material for the penetrating keratoplasty.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, 31 : Suppl.101 : 126

127 - PATON (D.), MARTINEZ (M.).

Corneal tissue, preservation for penetrating keratoplasty. Past, Present, Future.

Int. Surg. 1968, 49, 428-435.

128 - PAUFIQUE (L.) et coll.

Preparation of preserved human tissue in ophthalmology.

Ann. Ocul. (Paris), 1966, 199, 833-856.

129 - PAYRAU (P.).

Résultats cliniques de kératoplasties pratiquées à l'aide de greffons lyophilisés homogènes et hétérogènes.

Bull. Soc. Opht. France, 1957, 7-8, 392-397.

130 - PAYRAU (P.), BONEL (L.), GOYARD (M.).

Kératoplasties homogènes et hétérogènes pratiquées avec des greffons conservés par une méthode de lyophilisation.

Ann. d'Ocul., 1958, 191, 1-34.

131 - PAYRAU (P.), POULIQUEN (Y.).

Un procédé pratique de conservation des cornées et des sclères.

Bull. Soc. Opht. France, 1959, 3, 209-212.

132 - PAYRAU (P.), POULIQUEN (Y.).

Conservation des cornées et des sclères par silicodessication - Homogreffes et hétérogreffes.

Ann. d'Ocul., 1960, 193, 309-345.

133 - PAYRAU (P.), POULIQUEN (Y.), FAURE (J.P.).

Hétérogreffes de la cornée : étude expérimentale et premiers résultats cliniques.

Ann. Ocul., 1961, 194, 1.

134 - PENA CARILLO (J.), POLAK (F.M.).

Histochemical changes in endothelium of corneas stored in moist chambers.

Arch. Ophthal., 1964, 72, 811-819.

135 - PERRY (V.S.), ZINK (G.A.), HYATT (G.W.).

Tissue culture studies of the stored corneal grafts.

Transplant Bull. 1959, 6, 112-114.

136 - PLATTS (S.), REED (H.).

Use of D.M.S.O. for preserving corneal tissue.

Brit. J. Ophthal., 1963, 47, 334-338.

137 - POLAK (F.M.), Mc ENTYRE (J.M.).

Incorporation of sodium sulfate S 35 by cryopreserved corneal grafts in vivo.

Arch. Ophthal (Chicago)., 1969, 81, 577-582.

138 - POLAK (J.M.), SMELSER (G.K.).

The persistence of isotopically labelled cells in corneal grafts.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 110, 60-61.

139 - POLAK (F.M.), SMELSER (G.K.), ROSE J.

Long term survival of isotopically labelled stromal and endothelial cells in corneal homografts.

Amer. J. Ophthal., 1964, 57, 67

140 - POLAK (F.M.), TAKAMICHI KUDO, TAKAHASI (G.H.).

Viability of human Eye Bank cornea.

Arch. Ophthal., 1968, 79, 205-210.

141 - RAMMLER (D.H.), ZAFFARONI (A.).

Biological implications of D.M.S.O., based on a review of its chemical properties.

Annals of the N.Y. Academy of Sciences, 1967, 141, 13-23.

142 - RAPATZ (G.), LUYET (B.).

Patterns of ice formation in aqueous solution of polyvinyl pyrrolidone and temperatures of instability of the frozen solutions.

Biodynamica, 1968, 10, 149-166.

143 - RASMUSSEN (D.H.), MAC KENZIE (A.P.).

Phase diagram for the system water-D.M.S.O.

Nature (London), 1968, 220, 1315-1317.

144 - REIM (M.).

Über die Bedeutung des Friertstopverfahrens für den in-vivo status der Metabolite im Corneaepithal.

Graefe arch. Klin. Exp. Ophthal., 1967, 174, 97-102.

145 - REY (L.).

Conservation de la vie par le froid.

Coll. Actualités Scientifiques et Industrielles 1279

Ed. Hermann, Paris 1959.

146 - ROBBINS (J.E.), CAPELLA (J.A.), KAUFMAN (H.E.).

A study of endothelium in keratoplasty and corneal preservation.

Arch. Ophthal. 1965, 73, 242-247.

147 - DE ROETH (A.) Jr.

Respiration of the cornea.

Arch. Ophthal. (Chicago)., 1950, 44, 666-676.

148 - ROWE (A.W.).

Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing.

Cryobiology, 1966, 3, 12-18.

149 - RYCROFT (B.W.).

The low temperature preservation of the cornea for penetrating grafts p. 393-397 ; In : The cornea world, Congress. Washington, D.C. 1964.

Ed. by J.H. King Jr and J.W. Mc Tighe, Butterworth, London.

150 - SALCEDA (S.R.).

Endothelial cell survival after keratoplasty in rabbits. The effect of storage of donor corneas.

Arch. Ophthal. (Chicago). 1967, 78, 745-752.

151 - VON SALLMANN (L.) CARAVAGGIO (L.L.), GRIMES (P.).

Studies on the corneal endothelium of the rabbit : I : Cell division and Growth.

Amer. J; Ophthal., 1961, 51, 955-966.

152 - SAVUSHKINA (N.M.).

Morphological changes of cornea at low temperatures.

Experimental and pathohistological investigations-Oftal. Zh. 1962, 17, 235-238.

153 - SCHMIDT-MENDE (M.) et Coll.

Possibilities and limitation of frozen preservation of tissues and organs.

München Med. Wschr, 1966, 108, 1668-1672.

154 - SHANTHAVEERAPPA (T.R.), BOURNE (G.M.).

Some observations on Corneal Endothelium.

Acta Ophthalmologica (Kbh), 1963, 41, 603-608.

155 - SHERMAN (J.K.).

Freeze-thaw induced latent injury as a phenomenon in cryobiology.

Cryobiology, 1967, 3, 407-413.

156 - SHERMAN (J.K.) et coll.

Correlation of cellular ultrastructure before freezing, while frozen and after thawing, in assessing freeze-thaw induced injury.

Cryobiology., 1967, 4, 61-74.

156 bis - SICAULT (R.), PAYRAU (P.).

Une technique de kératoplastie transfixiante chez le lapin.
Arch. Ophtal. (Paris) 1967, 27, 775-782.

156 ter - SICAULT (R.), BERNARD (J.A.), PAYRAU (P.).

Nouvelle méthode simplifiée de kératoplastie transfixiante chez le lapin.
Annales Oculist. (Paris), 1969, 202, 209-217.

157 - SMELSER (G.K.), OZANIKS (V.).

Effects of quick freezing at very low temperatures of donor tissue in corneal transplants.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1946, 62, 274-277.

158 - SMITH (A.U.).

The problem of prolonged storage of the rabbit cornea at low temperatures.
In. cornea World Congress. Washington 1964 p. 384-392
Ed. by J.H. King Jr and J.W. Mc Tighe. Butterworth,
London 1965.

159 - SMITH (A.U.).

Problem of prolonged storage of the cornea.
Int. Ophtal. Clin., 1962, 2, 731-755.

160 - SMITH (A.U.), ASHWOOD-SMITH (M.J.).

Some in vitro studies on Rabbit Corneal Tissue.
Exp. Eye Res., 1963, 2, 71-87.

161 - SMOLIN (G.).

A technique for staining and separating Corneal Endothelium.
Am. J. Ophtal. 1968, 65, 232-236.

162 - SOLLNER (F.).

Der Einfluss verschiedener Aufbewahrungsbedingungen auf die Lichtdurchlässigkeit der Hornhaut.
Graefe Arch. Ophtal. 1964, 167, 150-157.

163 - SOLLNER (F.), HOCKWIN (O.), NOLL (E.), LICHT (W.).

Über des Verhalten der Aktivitäten einiger Ferments in Hornhäuten in Abhängigkeit von Konservierungsart und Konservierungsdauer.
Graefe Arch. Klin. Exp. Ophtal. 1966, 170, 277-285.

- 164 - SOMMERVILLE (G.M.), SHEA (M.).
Effects of freezing on the corneal endothelium.
Canad. J. Ophthalm., 1966, 1, 183-189.
- 165 - STAMPER (R.L.), DAYSON (M.).
Studies on freezing corneal tissues.
Exp. Eye Res. 1965, 4, 256-264.
- 166 - STANLEY (J.A.), MISHIWA (S.), KLYCE (S.D.).
In vivo Determination of Corneal Endothelium Permeability to Water.
Invest. Ophthalm., 1966, 5, 371-377.
- 167 - STOCKER (F.W.).
Preservation of donor cornea in autologous serum prior to penetrating grafts.
Amer. J; Ophthalm., 1965, 60, 21-24.
- 168 - STOCKER (F.N.), EIRING (A.), GEORGIAD (R.), GEORGIAD (N.).
Evolution of donor tissue for Cornea grafting.
Trans. Amer. Ophthalm. Soc. 1958, 56, 217-238.
- 169 - STOCKER (F.W.), EIRING (A.), GEORGIAD (R.), GEORGIAD (N.).
A tissue culture technique for growing corneal epithelial, stromal, and endothelial tissue separately.
Amer. J; Ophthalm. 1958, 46, 294-298.
- 170 - STOCKER (F.W.), EIRING (A.), GEORGIAD (R.), GEORGIAD (N.).
Evaluation of Viability of preserved rabbit corneas by tissue culture procedure.
Amer. J. Ophthalm. 1959, 47, 772-782.
- 171 - STOCKER (F.W.), KING (E.H.), LUCAS (D.O.), GEORGIAD (N.).
A comparison of two different staining methods for evaluating corneal endothelium viability.
Arch. Ophthalm. (Chicago) 1966, 76, 833-835.
- 172 - STOCKER (F.W.), KING (E.H.), LUCAS (D.O.), GEORGIAD (N.).
A comparison of two principles for evaluating corneal endothelial viability.
Arch. Ophthalm. (Chicago), 1966, 76, 836-838.
- 173 - STOCKER (F.W.), LEVENSON (D.), GEORGIAD (N.).
Medium Term Preservation of Corneal Tissue for grafting
Arch. Ophthalm. (Chicago), 1963, 70, 554-557.

- 174 - STOCKER (F.W.), MATTON VAN LEUWEN (M.Th.),
EIRING (A.), GEORGIADÉ (R.), GEORGIADÉ (N.)

Long term Preservation of donor tissue for corneal grafting
Am. J. Ophthalm. 1960, 49, 729-740.

- 175 - STOCKER (F.W.), MATTON VAN LEUWEN (M.Th.)
GEORGIADÉ (N.).

Host-tissue reaction to fresh and frozen corneas.
Am. J. Ophthalm. 1962, 53, 279-285.

- 176 - STUCCHI (C.A.), STREIFF (E.B.).

Keratoplasty with deep frozen homografts.
In Corneo Plastic Surgery, p. 511-517. Proc. 2nd. Corneo-
plastic Conference. London, 1967. Ed. by P.V. Rycroft-
Pergamon Press, Oxford, 1969.

- 177 - TAMVRA (H.).

Studies on the lactate metabolism of stored cornea under various
condition - II, Comparison of the entire eyeball method and the
sclero-corneal graft method.
Acta. Societatis. Ophthalmologica. Japonica. 1968, 72,
497-504.

- 178 - THOMAS (A.).

Physiologie de la vie latente. Congélation.
En survie et conservation biologique. Ed. Masson 1962.

- 179 - TOST (M.), SCHULZE (F.), SELISKO (G.).

Zur Kälteschädigung des Hornhautendothels.
Ophthalmologica (Basel) 1968, 155, 87-97

- 180 - TREVOR ROPER (P.D.).

Deep-frozen full thickness corneal grafts.
Arch. Ophthalm. (Chicago) 1964, 72, 741.

- 181 - WALKER (P.J.), WILEN (M.J.).

A controlled rate liquid nitrogen cooling device for freeze pre-
servation of living cells.
Lab. Pract. 1967, 16, 480-482.

